

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVANÇOS TECNOLÓGICOS NA CONSERVAÇÃO DE
SEMENTES E NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE
Handroanthus spp.**

Thiago Souza Campos

Engenheiro Agrônomo

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVANÇOS TECNOLÓGICOS NA CONSERVAÇÃO DE
SEMENTES E NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE
Handroanthus spp.**

Thiago Souza Campos

Orientadora: **Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta**

Coorientadores: **Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo**

Prof. Dr. Wagner Aparecido Vendrame

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

2024

C198a	Campos, Thiago Souza Avanços tecnológicos na conservação de sementes e na produção de mudas de <i>Handroanthus</i> spp. / Thiago Souza Campos. -- Jaboticabal, 2024 102 p. : fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Kathia Fernandes Lopes Pivetta Coorientador: Everlon Cid Rigobelo 1. Agronomia. 2. Plantas ornamentais. 3. Qualidade de sementes e mudas. 4. Rizobactérias. 5. Criopreservação. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Social: A pesquisa sobre técnicas de aprimoramento de qualidade de sementes e mudas de espécies nativas, tem impacto social significativo. Ao desenvolver métodos como o uso de bactérias promotoras de crescimento, imagens de raio-X em sementes e criopreservação, a pesquisa promove a eficiência na produção agrícola, especialmente em comunidades rurais onde o investimento em tecnologia é limitado. Isso pode reduzir a intensidade de trabalho, proporcionar oportunidades de educação e desenvolvimento de habilidades, e estimular o desenvolvimento rural. Além disso, ao preservar a biodiversidade, a pesquisa contribui para a restauração de ecossistemas naturais, promovendo o bem-estar social e ambiental.

Ambiental: As técnicas desenvolvidas neste estudo têm o potencial de melhorar a eficiência no uso de recursos e reduzir o impacto ambiental da agricultura. Ao possibilitar a seleção precisa de sementes viáveis, monitoramento não invasivo e conservação da diversidade genética, a pesquisa ajuda a evitar o desperdício de recursos e a preservar a biodiversidade. Isso pode levar a uma produção agrícola mais sustentável, com menor emissão de poluentes e menor necessidade de expansão agrícola em habitats naturais, contribuindo para um ambiente mais equilibrado e saudável.

Econômico: A implementação dessas técnicas pode aumentar a produtividade e qualidade das mudas e sementes, o que pode resultar em maior renda e lucratividade para os agricultores. Além disso, ao tornar a produção mais competitiva no mercado, a pesquisa pode atrair investimentos e promover a inovação no setor da floricultura. O uso das técnicas leva economia de custo, criação de empregos e crescimento econômico em áreas rurais e urbanas. Fortalecendo a cadeia de valor do setor agrícola, a pesquisa pode garantir um futuro estável e próspero para as regiões produtoras de ipê-amarelo e ipê-roxo, como outras arbóreas nativas.

Potential impact of this research

Social: Research on techniques to enhance the quality of seeds and seedlings of native species has significant social impact. By developing methods such as the use of growth-promoting bacteria, X-ray imaging of seeds, and cryopreservation, the research promotes efficiency in agricultural production, especially in rural communities where investment in technology is limited. This can reduce labor intensity, provide opportunities for education and skills development, and stimulate rural development. Additionally, by preserving biodiversity, the research contributes to the restoration of natural ecosystems, promoting social and environmental well-being

Environmental: The techniques developed in this study have the potential to improve resource efficiency and reduce the environmental impact of agriculture. By enabling precise selection of viable seeds, non-invasive monitoring, and conservation of genetic diversity, the research helps to avoid resource wastage and preserve biodiversity. This can lead to more sustainable agricultural production, with lower emissions of pollutants and reduced need for agricultural expansion into natural habitats, contributing to a more balanced and healthier environment.

Economic: The implementation of these techniques can increase the productivity and quality of seedlings and seeds, which can result in higher income and profitability for farmers. Additionally, by making production more competitive in the market, the research can attract investment and promote innovation in the floriculture sector. The use of these techniques leads to cost savings, job creation, and economic growth in rural and urban areas. By strengthening the value chain of the agricultural sector, the research can ensure a stable and prosperous future for regions producing trumpet trees, as well as other native tree species.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVANÇOS TECNOLÓGICOS NA CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Handroanthus* spp.

AUTOR: THIAGO SOUZA CAMPOS

ORIENTADORA: KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA

COORIENTADOR: WAGNER APARECIDO VENDRAME

COORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA (Participação Virtual)
Departamento de Produção Vegetal / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
KATHIA FERNANDES LOPES PIVETTA
Data: 17/04/2024 15:06:59-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. GILBERTO ROSTIROLLA BATISTA DE SOUZA (Participação Virtual)
Empresa Azul Pack / Paulínia/SP



Documento assinado digitalmente
GILBERTO ROSTIROLLA BATISTA DE SOUZA
Data: 24/04/2024 16:55:03-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. CARLA RAFAELE XAVIER COSTA (Participação Virtual)
Agrônoma Autônoma / Paulínia/SP



Documento assinado digitalmente
CARLA RAFAELE XAVIER COSTA
Data: 24/04/2024 19:15:47-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. EDUARDO CUSTODIO GASPARINO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
EDUARDO CUSTODIO GASPARINO
Data: 25/04/2024 10:59:53-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. ANA CAROLINA CORREA MUNIZ (Participação Virtual)
Autônoma / Taquaritinga/SP



Documento assinado digitalmente
ANA CAROLINA CORREA MUNIZ
Data: 29/04/2024 15:25:06-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 11 de abril de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THIAGO SOUZA CAMPOS, natural de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, nasceu no dia 28 de agosto de 1995. Iniciou o curso de Engenharia Agrônômica em agosto de 2012 pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus Umuarama – MG. Durante a sua graduação desenvolveu o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “Qualidade fisiológica de sementes de canola (*Brassica napus*) submetidas a testes de vigor” e obteve o título de Engenheiro Agrônomo em fevereiro de 2018. Em março de 2019, ingressou no curso de Pós-graduação *latu-sensu* em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, Estado do Rio Grande do Sul obtendo o título de Especialista em novembro de 2019, Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “Nutrição com boro na produtividade e qualidade em sementes armazenadas de Soja”. Em março de 2019, ingressou no curso de Mestrado em Produção Vegetal da Universidade Estadual de Goiás, Campus Ipameri, Estado de Goiás obtendo o título de Mestre em junho de 2020, com a dissertação intitulada “Desempenho de Cultivares de Milho Pipoca no Estado de Goiás”. Em agosto de 2020, iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV), Campus de Jaboticabal, integrando o grupo de estudos em Paisagismo e Floricultura (GEPFlor) - com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) código de financiamento 01 e posteriormente. A trajetória acadêmica é dedicada ao estudo da Propagação, Produção e Fisiologia de Plantas.

À Deus pela realização de mais um sonho, e a minha base, Maria Rita, Leila Maria, José Audes, Sandra Helena, Geusa Maria, Ordalita Oliveira, Carlos Anselmo e Adilson José e a minha irmã Loren Souza Campos, que foram minha estrutura e força para a realização de mais essa conquista.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus e minha família por me dar forças e guiar aos caminhos da ciência.

Aos amigos do doutorado Maryelle Barros, Thais Fortunato, Gabriela Pelegrini, Sandra Ferreira, Rafaela Graciano, Isabela Mocada, Estefanía Tavares, Soumaya Merzougui, Thaís Caetano e Felipe Lima pessoas que fizeram a diferença nesses quatro anos.

Aos parceiros do mestrado, Alana Costa, Ane Gabriele Vaz, Dra. Katiane Santiago Silva Benett e Dr. Cleiton Gredson Sabin Benett que foram em muitos momentos mais que amigos e me apoiaram nessa caminhada da pós-graduação.

Agradeço, em especial também, aos meus colegas e amigos Antonio Maricélio Borges de Souza, Gabriel Oliveira Matsumoto, Guilherme Rodrigues Vieira, Dr. Juan Ricardo Rocha, Vânia Pereira e Westefann dos Santos Sousa que me ajudaram incansavelmente na realização desse trabalho e como muitos outros, não teve dia, nem hora, chuva ou sol, estavam sempre comigo em todos os momentos, me ensinaram que não há vitória caminhando sozinho.

Aos amigos e familiares por cada pedacinho de ensinamento, conversa e conforto, Aline Souza, Andreia Queiroz, Arthur Costa, Barbara Biasoli, Bruna Souza, Caira Fernanda, Danilo Araújo, Daniel Guaracy, Dereck Ruszkowski, Eduardo Lira, Fabio Janoni, Guilherme Clemente, Hiago Fontoura, Heron Melo, Ieda Carla, João Paulo Weiler, Jourdan ten Caten, Josmar Pereira, Lilian Carvalho, Lohayne Borges, Luís Almeida, Luís Carlos, Lucas Andrade, Marina Leite, Maria Abadia, Marcos Lourenço, Matheus Martins, Michele Camargo, Miguel Carranza, Mychel Campos, Natasha Janovicci, Pedro Augusto, Rachel Almeida, Rafael Bezerra, Raquel Migliano, Raphael Vieira, Roberta Paiva, Rubia Andrea, Washigton Luis e Wesley Campos.

À minha orientadora Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta, que desde o primeiro contato me recebeu e me apoiou à caminhar essa jornada do ensino, pelos conselhos, pela amizade, honestidade e paciência que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Sua dedicação ao meu crescimento pessoal e acadêmico é inestimável.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo e Prof. Dr. Wagner A. Vendrame, pelo apoio e contribuições no meu crescimento científico e pessoal.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (Agronomia) da UNESP/FCAV – Campus Jaboticabal, em especial ao Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino, com o qual tive o privilégio de poder realizar o estágio de docência.

Aos Profs. Dr. Carlos Machado dos Santos, Dr. Adílio de Sá Junior e Dra. Flavia Andrea Nery Silva, que me orientaram na graduação e me incentivaram a seguir a vida acadêmica e sempre buscar o conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Os meus mais sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1.1 Família Bignoniaceae, gênero <i>Handroanthus</i> e espécies estudadas.....	1
1.1.1 <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.)	2
1.1.2 <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos	3
1.2 Produção de mudas florestais nativas	4
1.3 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas	5
1.3.1 Rizobactérias em mudas florestais.....	9
1.4 Conservação de plantas <i>in situ</i> e <i>ex situ</i>	11
1.5 Conservação e qualidade de sementes.....	12
1.5.1 Qualidade via análise imagem raio-X	14
1.5.2 Criopreservação de sementes	15
1.4 REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2 – Rizobactérias incrementam o crescimento e a qualidade das mudas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. Ex DC.) Mattos.....	28
2.1 RESUMO.....	28
2.2 INTRODUÇÃO	28
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.4 RESULTADOS.....	32
2.5 DISCUSSÃO	36
2.6 CONCLUSÕES	40
2.7 AGRADECIMENTOS.....	41
2.8 REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 3 – Promoção de crescimento de mudas de Ipê-roxo (Bignoniaceae) por inoculação de rizobactérias.....	45
3.1 RESUMO.....	45
3.2 INTRODUÇÃO	45
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.3.1 Produção e preparo do inóculo.....	48
3.3.2 Rizobacterização do substrato.....	48

3.3.3 Variáveis de crescimento e qualidade.....	49
3.3.4 Variáveis do comportamento fotossintético	49
3.3.5 Variáveis microbiológicas	50
3.3.6 Procedimentos estatísticos	50
3.4 RESULTADOS.....	51
3.5. DISCUSSÃO	56
3.6 CONCLUSÕES	61
3.7 AGRADECIMENTOS, APOIO FINANCEIRO E DIVULGAÇÃO COMPLETA.	61
3.8 REFERÊNCIAS.....	61
CAPÍTULO 4 – Teste de qualidade com uso de imagens de Raio-X e criopreservação em sementes de ipê-roxo.....	66
4.1 RESUMO.....	66
4.2 INTRODUÇÃO	66
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	68
4.3.1 Raio-X na qualidade das sementes.....	69
4.3.2 Criopreservação na germinação de sementes	69
4.3.3 Procedimentos estatísticos	71
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.4.1 Raio-X na qualidade das sementes.....	71
4.4.2 Criopreservação de sementes	75
4.5 CONCLUSÕES	82
4.6 AGRADECIMENTOS E APOIO FINANCEIRO	82
4.7 REFERÊNCIAS.....	82

AVANÇOS TECNOLÓGICOS NA CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Handroanthus* spp.

RESUMO – A demanda por técnicas que visam aprimorar a qualidade de sementes e mudas é constante, especialmente quando se trata de espécies nativas, nas quais o investimento geralmente é reduzido. O trabalho buscou estudar algumas inovações tecnológicas nas espécies de ipê-amarelo - *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos e ipê-roxo - *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. Para isso, foram estudadas três metodologias: a primeira foi o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal, a segunda foi o uso de imagens de raio-X em sementes e a terceira foi o uso da criopreservação em sementes. O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal, que tem recebido destaque devido à crescente busca por tecnologias sustentáveis que impulsionem a produção agrícola global. Notadamente, as bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus*, frequentemente encontradas na rizosfera, demonstram uma capacidade adicional de colonizar os tecidos da parte aérea das plantas. Esse processo contribui para a resistência das plantas a estresses abióticos, além de melhorar a disponibilidade e absorção de nutrientes. Já o uso de imagens de raio-X em sementes, técnica não destrutiva amplamente empregada para avaliar características internas das sementes sem comprometer sua viabilidade ou integridade. Essa técnica permite a visualização e análise de características como tamanho, forma, integridade interna, presença de danos, estágio de desenvolvimento embrionário, teor de água e uniformidade de preenchimento. Já a terceira técnica é o uso da criopreservação em sementes que busca a conservação a longo prazo da diversidade genética de espécies vegetais. A criopreservação envolve o armazenamento das sementes em temperaturas ultrabaixas, geralmente abaixo de -196 °C em nitrogênio líquido, o que interrompe o metabolismo celular e reduz os danos causados pelo envelhecimento das sementes. Ao preservar a variabilidade genética dessas espécies, a criopreservação contribui para a conservação da biodiversidade e para a restauração de ecossistemas naturais. O primeiro objetivo foi avaliar o efeito de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas na produção de mudas de ipê-amarelo e ipê-roxo. Para ambas as espécies, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e os tratamentos consistiram nos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Azospirillum brasilense* mais a ausência de microrganismos – controle; em quatro repetições e dez plantas por parcela. A inoculação de *B. amyloliquefaciens* promoveu incremento na altura da muda, no diâmetro do coleto, no comprimento de raiz, na área foliar, na MSPA, MSR e MST, além de ter aumentado o IQD para o ipê-amarelo, o que demonstra que o uso de rizobactérias é promissor para produção de mudas dessa espécie, sendo a bactéria *B. amyloliquefaciens* o inoculante mais eficiente. Já para o ipê-roxo os inóculos *A. brasilense* e *B. subtilis* promoveram aumento no crescimento, acúmulo de biomassa, maiores níveis de qualidade e melhorias na fluorescência da clorofila em comparação com o tratamento controle, evidenciando que as rizobactérias utilizadas no presente estudo promovem o desenvolvimento, aumentam a eficiência fotossintética. O segundo objetivo deste

trabalho foi investigar a eficácia do uso da técnica de raio-X para avaliar a viabilidade de sementes de ipê-roxo. Foi utilizado equipamento de raio-X 2D KUBTEC® XPERT® 80. Após a exposição à radiação de raio-X, as sementes foram submetidas ao teste de germinação. A análise das imagens permitiu identificar que as sementes que apresentavam alto grau de desidratação ou ausência do eixo-embrionário não germinaram ou teve a formação de plântulas anormais. O terceiro objetivo do estudo foi avaliar a eficiência da criopreservação sem e com uso de soluções crioprotetoras (PVS2 e PVS3) combinadas com o floroglucinol para a preservação de sementes de ipê-roxo. Os resultados mostraram que o uso de soluções PVS2 e PVS3 não é recomendado para a espécie, no entanto, o uso somente do nitrogênio líquido é promissor para criopreservação das sementes de ipê-roxo.

Palavras-chave: plantas ornamentais, rizobactérias, qualidade de sementes e mudas, raio-X de sementes, criopreservação.

TECHNOLOGICAL ADVANCEMENTS IN SEED CONSERVATION AND PRODUCTION OF *Handroanthus* spp. SEEDLINGS

ABSTRACT – The demand for techniques aimed at improving the quality of seeds and seedlings is constant, especially when it comes to native species, where investment is usually limited. The study sought to investigate some technological innovations in the species *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos and *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, commonly known as golden and lavender trumpet tree, respectively. For this purpose, three methodologies were studied: the first was the use of plant growth-promoting bacteria, the second was the use of X-ray imaging in seeds, and the third was the use of seed cryopreservation. The use of plant growth-promoting bacteria has received attention due to the increasing demand for sustainable technologies that boost global agricultural production. Notably, bacteria of the genera *Azospirillum* and *Bacillus*, often found in the rhizosphere, demonstrate an additional ability to colonize plant aerial tissues. This process contributes to plant resistance to abiotic stresses, as well as improving nutrient availability and absorption. X-ray imaging in seeds is a non-destructive technique widely used to evaluate internal seed characteristics without compromising their viability or integrity. This technique allows visualization and analysis of characteristics such as size, shape, internal integrity, presence of damage, embryonic development stage, moisture content, and filling uniformity. The third technique, seed cryopreservation, aims at long-term conservation of the genetic diversity of plant species. Cryopreservation involves storing seeds at ultra-low temperatures, usually below -196 °C in liquid nitrogen, which halts cellular metabolism and reduces damage caused by seed aging. By preserving the genetic variability of these species, cryopreservation contributes to biodiversity conservation and restoration of natural ecosystems. The first objective was to evaluate the effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the production of golden and lavender trumpet tree seedlings. For both species, the experimental design was completely randomized, and treatments consisted of the microorganisms *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Azospirillum brasilense* plus the absence of microorganisms - control; in four replicates and ten plants per plot. Inoculation of *B. amyloliquefaciens* promoted an increase in seedling height, stem diameter, root length, leaf area, photosynthetic rate, transpiration rate, and stomatal conductance, as well as increased seedling quality index for golden trumpet tree, demonstrating that the use of rhizobacteria is promising for seedling production of this species, with *B. amyloliquefaciens* being the most efficient inoculant. For lavender trumpet tree, inoculants *A. brasilense* and *B. subtilis* promoted growth enhancement, biomass accumulation, higher quality levels, and improvements in chlorophyll fluorescence compared to the control treatment, showing that the rhizobacteria used in this study promote development and increase photosynthetic efficiency. The second objective of this work was to investigate the effectiveness of using X-ray technique to evaluate the viability of lavender trumpet tree seeds. A KUBTEC® XPERT® 80 2D X-ray equipment was used. After exposure to X-ray radiation, the seeds were subjected to germination testing. Image analysis allowed identification that seeds with high dehydration or

absence of the embryonic axis did not germinate or had the formation of abnormal seedlings. The third objective of the study was to evaluate the efficiency of cryopreservation with and without the use of cryoprotective solutions (PVS2 and PVS3) combined with floroglucinol for the preservation of lavender trumpet tree seeds. The results showed that the use of PVS2 and PVS3 solutions is not recommended for the species; however, the use of only liquid nitrogen is promising for cryopreservation of lavender trumpet tree seeds.

Keywords: ornamental plants, rhizobacteria, quality of seeds and seedlings, seed X-ray, cryopreservation.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Família Bignoniaceae, gênero *Handroanthus* e espécies estudadas

A Bignoniaceae, composta por cerca de 82 gêneros e 840 espécies, é predominantemente Pantropical, com poucos representantes nas regiões temperadas (Lohmann, 2018). No Brasil ocorrem 33 gêneros e 406 espécies, nos biomas Amazonia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Lohmann, 2015). As plantas desta família desempenham papel significativo em diversos aspectos econômicos, destacando-se pela qualidade de sua madeira, amplamente empregada na construção civil e na indústria madeireira, e o seu aspecto bastante explorado que é o notável potencial ornamental, despertando o interesse na inclusão das espécies em projetos paisagísticos ou na arborização urbana (Lorenzi, 2020).

Além da importância econômica, o grupo possui relevância etnobotânica e medicinal. Algumas espécies são usadas na medicina popular e farmacêutica e são aplicadas no tratamento de diversas doenças, como câncer, acidentes ofídicos, dermatose, epilepsia, cólera, mialgia, malária, problemas cardiovasculares, doenças sexualmente transmissíveis e distúrbios gastrointestinais, urinários, respiratórios, ginecológicos e hepáticos, o que faz dessas plantas uma potencial fonte de compostos bioativos, despertando interesse na indústria farmacêutica (Rahmatullah et al., 2010; Vb et al., 2015).

Originalmente, todas as espécies conhecidas como ipês eram incluídas no gênero *Tabebuia*, no entanto, a descrição de novas espécies na família e a grande variabilidade morfológica, acabaram levando a uma expansão nos limites genéricos iniciais. Assim, à medida que surgiam novos estudos, o conceito tradicional se modificava, de modo que a circunscrição original não se manteve ao longo do tempo. Visando resolver a questão, Mattos, em 1970, dividiu as espécies de ipês em dois gêneros, *Tabebuia* e *Handroanthus*, este último criado, especialmente, para os representantes brasileiros. Porém, tal interpretação foi fortemente criticada por Gentry, que tornou a posicionar todas as espécies de ipês no grupo original. No entanto, Grose e Olmstead, em 2007, propuseram, com base em estudos filogenéticos, a divisão do gênero *Tabebuia* em três novos gêneros, *Tabebuia*, *Handroanthus* e *Roseodendron*,

confirmando, em definitivo, a segregação proposta por Mattos e a existência de linhagens diferentes dentro do grupo (Santos, 2017).

O gênero *Handroanthus* apresenta 27 espécies, é nativo no Brasil, porém, não endêmico; ocorre nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal; representado por indivíduos arbóreos, raramente arbustivos, apresenta como principais características folhas compostas por 3 a 9 folíolos estreitos a ovais, cobertos por tricomas ao longo das axilas das veias. Suas flores são tubulares, variando em cores de amarelo a magenta e os frutos são cápsulas alongadas e as plantas são reconhecidas por seu cerne distintivo e pela presença de lapachol (Lohmann, 2024).

1.1.1 *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.)

A espécie *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos, popularmente conhecida como ipê-amarelo, é uma árvore nativa brasileira de ampla distribuição geográfica, presente nos biomas Cerrado, Mata Atlântica e Pampa, tem potencial econômico e é amplamente utilizada na arborização urbana e na recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 2020). É também uma espécie lenhosa de alta densidade, muito requisitada na indústria da construção civil e moveleira, podendo ser cultivada em integração lavoura-pecuária-silvicultura (FLS) e consorciada com outras espécies em sistemas agroflorestais (SAFs) (Candaten et al., 2020; Oliveira Junior et al., 2020)

A reprodução do ipê-amarelo geralmente ocorre através de sementes, as quais, embora sejam abundantemente produzidas, podem enfrentar desafios de germinação e conservação, impactando negativamente a qualidade da produção de mudas. Dessa forma, a crescente demanda por mudas de espécies nativas destaca a importância de elaborar protocolos que otimizem a qualidade de sementes e a produção mudas de alta qualidade (Sampaio et al., 2013; Mendes-Rodrigues et al., 2023).

Um ponto importante em relação ao uso do ipê-amarelo é que o mesmo pode ser facilmente confundido quanto a outras espécie, pois abrange um grupo diverso de espécies somente pelo fato de apresentarem a mesma coloração amarela de flor. Logo existe uma variedade de ipês-amarelos (popular) como nomes científicos diferentes, são elas: *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos, *Handroanthus ochraceus* (Cham.) Mattos, *Handroanthus albus* (Cham.) Mattos, *Handroanthus*

serratifolius (Vahl) S. O. Grose, *Handroanthus vellosi* (Toledo) Mattos, *Handroanthus billbergii* (Bureau e K.Schum.) S.O.Grose, *Handroanthus spongiosus* (Rizzini) S. Grose, *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore, *Tabebuia umbellata* (Sond.) Sandwith (Lohmann, 2024).

1.1.2 *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos

A espécie *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, conhecida popularmente como ipê-roxo, é uma árvore de madeira nobre devido à sua densidade, dureza, resistência, beleza e durabilidade, que pode atingir até 30 metros de altura e 80 cm de diâmetro do tronco, a qual possui ampla distribuição em florestas tropicais sazonalmente secas, abrangendo áreas do sul e da Mesoamérica (Lorenzi, 2020; Silva-Junior et al., 2018). É uma espécie perene, com dispersão anemocória, de fecundação cruzada e com autoincompatibilidade (Bittencourt, 2010).

A espécie também é encontrada por nomenclaturas antigas ou equivocadas como: *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Mattos., *Handroanthus avellaneda* (Lorentz ex Griseb.) Mattos, *Tabebuia avellaneda* (Lorentz ex Griseb.), *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, *Tabebuia dugandii* Standl., *Tabebuia ipe* (Mart.) Standl. *Tabebuia nicaraguensis* S.F. Blake, *Tabebuia palmeri* Rose, *Tabebuia schunkevigoi* D.R. Simpson, *Tecoma adenophylla* Bureau ex K. Schum, *Tecoma avellaneda* (Lorentz ex Griseb.) Speg., *Tecoma impetiginosa* Mart., *Tecoma integra* (Sprague) Chodat. (WFO, 2024).

O ipê-roxo é fonte significativa de produtos naturais, destacando-se os quinoides extraídos da sua casca, que se apresentam como promissores antitumorais, anti-inflamatórios, antioxidantes, antibacterianos e anti-leishmaníaco (Ahmad et al., 2020; Mariano et al., 2022; Valle et al., 2023; Santos et al., 2024). Essa espécie também pode ser utilizada em restauração florestal e no paisagismo urbano pela exuberância de sua floração, sendo recomendado apenas o uso de mudas saudáveis, vigorosas e de procedência conhecida (Chaves et al., 2018; Viana et al., 2019; Lorenzi, 2020).

Existe uma situação preocupante que é o aumento das atividades antrópicas, que tem resultado na fragmentação de áreas naturais, propiciando o isolamento de

populações e aumentado a probabilidade de erosão genética (Pimenta et al., 2023). Devido à essa exploração predatória, *H. impetiginosus* foi categorizado como uma espécie quase ameaçada de extinção de acordo com a lista da IUCN (2020).

1.2 Produção de mudas florestais nativas

Desde o início da década de 2010, tem sido observado um aumento na demanda por sementes e mudas de espécies nativas, impulsionado pelas novas exigências governamentais relacionadas à recuperação e preservação de áreas degradadas (Mapa, 2011). Logo para atender essa demanda os viveiros devem passar por atualizações e a construção de infraestruturas mais robustas (Silva et al., 2015).

A produção de mudas florestais nativas desempenha um papel fundamental na prática da silvicultura, abrangendo operações cruciais para o estabelecimento de florestas, o desenvolvimento de povoamentos florestais e a recuperação de áreas degradadas (Ronquim et al., 2020). Quando se trata de espécies nativas, a aquisição dessas mudas nos viveiros comerciais regionais pode ser desafiadora, principalmente devido à escassez de conhecimento sobre seus métodos de produção ou às procedências devido às dificuldades associadas à obtenção de sementes na natureza, como a identificação correta da espécie, a sazonalidade de produção, período de reprodução, tempo correto para coleta e beneficiamento das sementes (Oliveira et al., 2016).

A Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, estabelece normas para a produção, comercialização e utilização de sementes no Brasil. Essa legislação tem como objetivo primordial assegurar a qualidade genética, fisiológica e sanitária das sementes, visando à regularidade do mercado e à proteção dos interesses dos agricultores (Brasil, 2003). Essa abordagem legal compreende diversos aspectos, incluindo normas para a produção e comercialização de sementes, estabelecimento de padrões de qualidade, procedimentos de certificação, fiscalização e a definição das responsabilidades dos órgãos competentes no controle desse setor (Brasil, 2017).

No caso específico de produção de mudas de espécies florestais nativas, deve-se observar o capítulo XII do Decreto 5.153/2004, em seus artigos 143 a 175. Para a produção de mudas de espécies nativas são exigidas práticas específicas para

assegurar a origem do material e o desenvolvimento saudável das plantas. O produtor e o viveiro devem ser registrados no RENASEM (Registro Nacional de Sementes e Mudas) e o processo deve ser acompanhado por responsável técnico pela produção de sementes ou mudas, podendo ser Engenheiro (a) Agrônomo (a) ou Engenheiro (a) Florestal registrado no CREA (Conselho Regional de Engenharia e Agronomia) para que sejam assegurados e certificados (Brasil, 2004).

As etapas de produção de mudas nativas florestais são descritas por Scremin-Dias et al. (2006) e Oliveira et al. (2016), no entanto os procedimentos estabelecidos não são aplicáveis a todas as espécies. Nesse sentido, deve-se incentivar a pesquisa e o desenvolvimento de técnicas inovadoras, buscando aprimorar significativamente a produção de mudas nativas de qualidade (Ronquim et al., 2020).

Diversos estudos voltados à melhoria da qualidade das mudas nativas são conduzidos anualmente e, no caso do ipê-amarelo e do ipê-roxo, vários autores buscam identificar melhores substratos, recipientes, fertilizantes, sombreamento, técnicas de propagação vegetativa, entre outros avanços (Leite et al., 2017ab; Rabaiolli et al., 2017; Chaves et al., 2018; Máximo et al., 2020; Cunha et al., 2022; Rezende et al., 2023). Entre as tecnologias na produção de mudas, a utilização de microrganismos benéficos, como neste estudo, mencionados apenas como rizobactérias, têm demonstrado resultados promissores e apresentam alto potencial de aplicação na produção de mudas florestais (Monteiro et al., 2014).

1.3 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

Os primeiros reportes sobre a utilização de rizobactérias benéficas às plantas foram há cinco décadas (Patel, 1969) antes da atualidade. Contudo, o entendimento completo de seu modo de ação e a forma como podem ser aplicadas com êxito para otimizar a produção ainda não foi completamente elucidado (Kushwaha et al., 2024). Para que as rizobactérias sejam eficazes elas devem possuir três propriedades: devem ser capazes de colonizar a superfície da raiz; devem ser capazes de sobreviver e competir com outras microbiotas na rizosfera, a fim de expressarem a sua promoção do crescimento das plantas e atividades de biocontrole e; devem ser capazes de promover o crescimento das plantas (Kloepper, 1978; Lugtenberg e Kamilova, 2009).

As rizobactérias iniciam sua ação pela colonização radicular, que é dada pela capacidade das mesmas se estabelecerem nas raízes das plantas, de se propagarem, sobreviverem e se dispersarem ao longo da raiz em crescimento na presença de microflora natural (Santoyo et al., 2021). Para que isso aconteça, os exsudados das raízes das plantas devem exercer efeito de quimiotaxia positivo nas bactérias do solo, o que lhes permite encontrar e colonizar a rizosfera e as raízes das plantas (Hassan et al., 2019).

As rizobactérias também podem agir na proteção das plantas contra os fitopatógenos e assim promover o seu crescimento através da formação de biofilmes (Meneses et al., 2011). Estes desempenham um papel na proteção dos locais de colonização através dos quais os patógenos colonizariam e infectariam as plantas (Seneviratne et al., 2011). Além disso, os biofilmes estão associados ao aumento da absorção de nutrientes pelas plantas e auxiliam na sua adaptação às mudanças nas condições ambientais (Nayak et al., 2020). A importância dos biofilmes se estende à ligação do Na^+ , retendo fósforo livre e outros nutrientes essenciais, permitindo o acesso da planta à eles (Gupta et al., 2015). Visto isso, a formação de biofilme se assemelha à colonização radicular, pois não influencia diretamente o crescimento das plantas nem atua contra patógenos, mas as rizobactérias que possuem a característica oferecem vantagem adicional sobre aquelas que não a possuem (De-la-Peña e Loyola-Vargas, 2014).

Portanto, as rizobactérias promovem o crescimento das plantas direta e indiretamente, sendo o primeiro promovido através da produção de fitohormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos; e o segundo dado ao impedir o crescimento de patógenos através da produção de antibióticos e da competição por espaço e nutrientes (Chandran et al., 2021).

As rizobactérias podem ser classificadas de acordo com seu principal modo de ação nas plantas, sendo divididas em quatro grupos: biopesticidas, fitoestimulantes, fitorremediadores e agentes de controle de estresse, bem como os biofertilizantes (De-la-Peña e Loyola-Vargas, 2014).

As rizobactérias que foram desenvolvidas em biopesticidas são aquelas que inibem o crescimento de patógenos através da produção de antibióticos e compostos voláteis, como por exemplo espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e

Streptomyces (Singh et al., 2019; Riaz et al., 2021). Já os fitoestimuladores são aquelas rizobactérias que proporcionam estímulo no crescimento das plantas através da produção de fitohormônios como a auxina ácido indol-3-acético (AIA), sendo exemplos notáveis as espécies dos gêneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* (Gupta et al., 2016). Os agentes fitorremediadores e de controle do estresse são aqueles que podem degradar os poluentes do solo e produzir a enzima ACC deaminase que auxilia na tolerância ao estresse, como por exemplo, *Pseudomonas* spp. (Su et al., 2014; Zhu et al., 2023;). Finalmente, os biofertilizantes fornecem nutrientes à planta promovendo assim o seu crescimento, alguns exemplos incluem espécies pertencentes aos gêneros *Allorhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (Singh et al., 2019; Riaz et al., 2021; Aloo et al., 2022).

Um dos principais fitohormônios no crescimento e desenvolvimento das plantas é a auxina. Quando o L-triptofano está presente nos exsudatos radiculares, algumas rizobactérias podem sintetizar o AIA, desencadeando o aumento do alongamento e da divisão celular, dominância apical e diferenciação tecidual (Ul Hassan e Bano, 2015). O incremento na divisão celular conduz ao aumento no comprimento das raízes, proporcionando uma ampliação na área de superfície das mesmas. Isso viabiliza maior absorção de nutrientes do solo, resultando no crescimento mais robusto da planta (Goswami et al., 2016). Adicionalmente, o AIA provoca o afrouxamento das paredes celulares das plantas, ocasionando acréscimo na emissão de exsudatos radiculares, isso, por sua vez, propicia a proliferação mais intensa dos microorganismos benéficos na rizosfera (Zhang et al., 2007). Além disso, o AIA desempenha uma função crucial na resistência ao estresse salino, inibindo a formação de espécies reativas de oxigênio, e na promoção da defesa contra doenças associadas às rizobactérias (Kawano, 2002; Hmaeid et al., 2019; Shah et al., 2022).

Em situações de estresse as plantas sintetizam etileno, que desempenha papel na regulação da homeostase vegetal, resultando na diminuição do crescimento das raízes e dos brotos (Taiz et al., 2017). Durante a síntese do etileno, o 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) é formado como o precursor do mesmo, e esse processo ocorre em duas etapas, sendo uma responsável pelo desencadeamento dos mecanismos de defesa, enquanto a outra está associada à abscisão, senescência, clorose e até a morte (Binder, 2020). As rizobactérias têm a

habilidade de sintetizar a enzima ACC desaminase, que tem a capacidade de hidrolisar o ACC, levando à diminuição na produção de etileno pela planta (Su et al., 2024). Isso assegura que, à medida que as condições de estresse ambiental persistem, o desenvolvimento das plantas também continue. Outro fator é que durante o processo de hidrólise do ACC pela ACC desaminase, ocorre a liberação de amônia, que é aproveitada pelas rizobactérias como fonte de nitrogênio e energia e esse nitrogênio pode então também estar acessível à planta em situações de escassez desse elemento (Orozco-Mosqueda et al., 2020).

As rizobactérias que têm a capacidade de fixar nitrogênio possuem o agrupamento de genes que codifica a enzima nitrogenase responsável pela fixação de nitrogênio (Smith et al., 2013; Santoyo et al., 2021). A presença de bactérias fixadoras de nitrogênio no solo significa que há mais nitrogênio disponível para as plantas, reduzindo assim a quantidade de fertilizante artificial necessário para ser aplicado ao solo como suplemento (Aloo et al., 2022; Chandran et al., 2021).

Depois do nitrogênio, o fosfato é o segundo nutriente mais importante para as plantas e, embora amplamente presente, sua pronta disponibilidade para uso pelas plantas é limitada, sendo que, um dos fatores que o torna indisponível, é da formação de complexos com alumínio, cálcio e ferro que o tornam imóvel e menos solúvel na solução do solo (Prado, 2020). Algumas rizobactérias são eficazes na solubilização destes complexos, tornando assim o fosfato mais disponível para absorção pelas plantas, tais como *Azobacter* spp., *Azospirillum* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. e *Serratia* spp., pois produzem ácidos inorgânicos (acetato, oxalato, succinato, citrato e gluconato) que solubilizam o fosfato de complexos minerais (Andrade et al., 2023).

O ferro (Fe) disponível no solo pode ser ligado a diversas moléculas e nas plantas esse mineral é requerido para a síntese de moléculas de clorofila, desempenhando assim, importante função no processo de crescimento vegetal (Taiz et al., 2017; Prado, 2020). Para aproveitar o ferro presente no solo, tanto as rizobactérias, quanto as plantas desenvolveram estratégias similares para a mobilização desse elemento, sendo as rizobactérias, geralmente mais competitivas e eficientes nesse processo em comparação às plantas (Crowley, 2006; Chadran et al., 2021). As rizobactérias utilizam sideróforos que possuem forte afinidade para ligar a

íons férricos (Fe^{3+}) (Santoyo et al., 2021). Sideróforos são caracterizados como moléculas peptídicas de pequeno porte que possuem cadeias laterais e grupos funcionais, proporcionando uma variedade de ligantes de alta afinidade para coordenar Fe^{3+} (Ansari et al., 2017). Os sideróforos sintetizados por bactérias são essenciais, já que apresentam maior afinidade pelo Fe^{3+} do que os quelantes produzidos pelos patógenos, tornando o Fe^{3+} menos disponível para os patógenos e mais disponível para as plantas, retardando assim, a proliferação de patógenos, uma vez que estes têm acesso limitado ao Fe^{3+} disponível (Kloepper et al., 1980; Trapet et al., 2016).

Curiosamente, a maioria dos isolados que sintetizam sideróforos também demonstram a capacidade de solubilizar fosfato, como indicado por Son et al. (2014). A produção de sideróforos está comumente associada a espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Enterobacter* e *Serratia*. Sendo assim seleção de rizobactérias com modo de ação múltiplo ou mesmo o uso de mais de uma cepa com modo de ação diferente, contribui para melhor eficiência na aplicação de rizobactérias em plantas (Ansari et al., 2017).

1.3.1 Rizobactérias em mudas florestais

Estudos têm demonstrado os efeitos positivos dessas interações, destacando o potencial uso mudas de espécies florestais. Nos últimos quatro anos os efeitos destas bactérias em espécies arbóreas vêm sendo reportado por diversos autores (Kondo et al., 2020; Bettegowda et al., 2021; Duan et al., 2022; Liu et al., 2022; Campos et al., 2023; Loguercio et al., 2023; Ribeiro et al., 2023; São José et al., 2023; Souza et al., 2023; Cabanzo-Atilano et al., 2024; Kondo et al., 2024). O manejo da simbiose planta-rizobactéria para as espécies florestais demonstram os efeitos positivos das interações e destacam o potencial uso das rizobactérias para melhorar o desenvolvimento das mudas. Visto isso, o manejo da simbiose para as espécies florestais pode contribuir para melhor absorção de nutrientes, facilitação da adaptação das mudas, compartilhamento de recursos, estimulação do uso de comunidades microbianas nativas do solo, respostas das plantas aos fitopatógenos e as modulações fisiológicas para melhorar a adaptação a condições ambientais adversas (Monteiro et al., 2014; Puri et al., 2017).

As rizobactérias *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e *B. megaterium* aumentaram o crescimento da raiz principal e os teores de P e N na parte aérea na fase do caule em mudas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) (Kondo et al., 2024). Campos et al. (2023) verificaram que a inoculação da rizobactéria *B. subtilis* proporcionou maior crescimento e qualidade das mudas de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). *B. subtilis* aplicados no substrato proporcionou desenvolvimento significativo na altura e biomassa em mudas de *Eucalyptus urograndis* aos 30 dias após o plantio (Luciano et al., 2023). O inóculo *Bacillus subtilis*, promoveu o aumento da biomassa da raiz, da altura, do diâmetro do caule e comprimento da raiz, além de melhorar a qualidade das mudas de *Pinus bungeana* Zucc. (Liu et al., 2022).

Foi observada interação entre *Theobroma cacao* L. e as rizobactérias do gênero *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, uma vez que ocorreu aumento da biomassa seca da raiz e da relação biomassa raiz e parte aérea em relação as plantas não inoculadas (Loguercio et al., 2023). Na qualidade das mudas de *Corymbia citriodora* (Hook.) a aplicação de *Trichoderma* e *B. subtilis* apresentou resultados positivos em relação ao controle para o Índice de Qualidade de Dickson e no crescimento inicial (Ribeiro et al., 2023). A inoculação de *Azospirillum brasilense* no substrato promoveu maior aérea foliar e incremento para todos os índices fisiológicos em mudas de *Cordia alliodora* Ruiz e Pavon (Souza et al., 2023a).

Mudas de *Pinus taeda* L. que foram inoculadas com *Bacillus amyloliquefaciens* apresentaram um aumento significativo na altura das plantas (9,8%), na massa seca das raízes (60%) e no Índice de Qualidade de Dickson (30%), comparadas às plantas não inoculadas (Kondo et al., 2020). Já a altura das plantas, o diâmetro do caule e o número de bactérias do solo aumentou com a inoculação de *B. amyloliquefaciens* em *Malus hupehensis* Rehd. quando comparada com o controle sem inoculante (Duan et al., 2022). O uso de *Bacillus megaterium* permitiu a dissolução eficiente do fósforo inorgânico e promoveu o crescimento de *Cinnamomum camphora* (Kapur) (Qian e Ye, 2020).

Demais rizobactérias, além das estudadas, também apresentaram resultados promissores. O índice médio de crescimento vegetal e a biomassa seca de mudas inoculadas com o consórcio de rizobactérias (*Rhizophagus fasciculatus*, *Azotobacter*

chroococcum, *Bacillus coagulans* e *Trichoderma harzianum*) foram, respectivamente, 42% e 39% maiores, do que mudas não inoculadas de *Dalbergia sissoo* Roxb. ex DC (Bettegowda et al., 2021). Na produção de mudas de *Acacia mearnsii* De Wild. a inoculação de *Bradyrhizobium guangdongense* melhorou de maneira geral o crescimento das plantas (São José et al., 2023). A espécie *Pseudomonas tolaasii* apresentou efeito positivo nas variáveis altura, diâmetro do caule, área foliar e massa seca da parte aérea quando inoculadas em mudas de *Rubus* spp. (Cabanzo-Atilano et al., 2024). O uso combinado de *Trichoderma longibrachiatum* e *Burkholderia stabilis* reduziu efetivamente a incidência e severidade da doença tombamento (*Fusarium oxysporum*), promovendo o crescimento de mudas de *Pinus massoniana* Lamb. (Yu et al., 2024).

1.4 Conservação de plantas *in situ* e *ex situ*

A pesquisa e a conservação das espécies vegetais nativas são cruciais para a preservação da biodiversidade, proteção de espécies em risco e prevenção do agravamento do status de ameaça de outras espécies. Durante a Conferência das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas (COP) em 2022, houve a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CBD) que adotou a Estrutura Global de Biodiversidade Kunming-Montreal (GBF), a qual definiu 23 metas visando deter a perda contínua da biodiversidade. Relacionado à conservação vegetal, duas delas chamam a atenção: a meta 2 e a 7. A meta 2, que buscará garantir que, até o ano de 2030, pelo menos 30% das áreas de ecossistemas terrestres sejam objeto de processos de restauração eficazes, com o propósito de aprimorar a biodiversidade, as funções e os serviços ecossistêmicos, assim como a integridade ecológica e a conectividade; e a meta 7, que visa assegurar medidas urgentes para conter a extinção causada pelo homem de espécies ameaçadas e promover sua recuperação, com foco na redução significativa do risco de extinção. Isso envolve a manutenção e restauração da diversidade genética em populações de espécies nativas, selvagens e domesticadas para preservar sua adaptabilidade. Essas ações abrangem a conservação tanto *in situ* quanto *ex situ*, bem como práticas de gestão sustentável (CBD, 2022).

Os métodos de conservação *in situ* e *ex situ* representam as duas principais estratégias para a conservação de plantas. A conservação *in situ* refere-se à proteção e gestão de espécies vegetais dentro de seus habitats naturais, enquanto a conservação *ex situ* diz respeito à proteção de espécies vegetais em ambientes fora de seus habitats naturais (Engelmann e Engels 2002; Rotach, 2005; Zegeye, 2017). A conservação *in situ* abrange áreas como reservas naturais, parques nacionais, refúgios de vida selvagem e terras privadas, que contribui para a adaptação e evolução contínua das espécies e populações em seus ambientes naturais, além de promover e preservar os processos e interações ecológicas (Rotach, 2005). Embora a conservação *in situ* seja amplamente reconhecida pelos conservacionistas como uma prioridade, esse método isoladamente não é suficiente para garantir a preservação e proteção das espécies de plantas, especialmente considerando o rápido ritmo de perda e degradação de habitats em escala global (Braverman, 2014).

A conservação *ex situ* então visa complementar os esforços *in situ* para apoiar e restaurar populações nativas, envolvendo a proteção de plantas e germoplasma fora de seus habitats naturais. Essa abordagem é meramente uma contingência e deve ser encarada como uma medida temporária, não como uma solução permanente, para a preservação de espécies de plantas ameaçadas (Engelmann e Engels, 2002). Os métodos *ex situ* complementam a conservação *in situ* ao garantir a preservação e o acesso facilitado à vastas coleções de germoplasma vegetal, promovendo assim a pesquisa, o melhoramento genético e a educação (Volis e Bleche, 2010). Existem muitas formas e abordagens para a conservação *ex situ*, incluindo coleções vivas (jardins botânicos e viveiros), bancos de sementes, criopreservação e cultura *in vitro*.

1.5 Conservação e qualidade de sementes

Na preservação de espécies vegetais, a conservação de sementes é uma das estratégias mais eficazes, porém a viabilidade desse método varia de acordo com a espécie em questão (Cochrane et al., 2007). Aquelas que produzem sementes com capacidade fisiológica de serem armazenadas, denominadas sementes ortodoxas, são especialmente adequadas para essa finalidade, já que estas são capazes de suportar condições de armazenamento prolongado sem comprometer sua viabilidade

ou capacidade de germinação (Carvalho e Nakagawa, 2012; Copeland e McDonald, 2012).

Para a conservação dessas sementes, as mesmas devem ser secas até um grau de umidade adequado, geralmente entre 5% e 10% dependendo da espécie, pois isso ajuda a prevenir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e a reduzir o risco de deterioração durante o armazenamento (Garcia et al., 2004). As sementes requerem armazenamento em recipientes herméticos para mitigar a entrada de umidade e evitar a infestação por insetos, como sacos de papel ou alumínio, pois proporcionam uma barreira eficaz contra a umidade externa e a penetração de pragas (Carvalho e Nakagawa, 2012).

Por fim, deve-se monitorar regularmente as condições de armazenamento que abrange aspectos como temperatura, umidade e integridade das sementes. As sementes devem ser mantidas em ambientes frescos e secos, com temperaturas geralmente entre 0 °C e 10 °C e umidade relativa abaixo de 50%. Esse monitoramento sistemático permite a detecção precoce de quaisquer irregularidades ou desafios que possam surgir durante o processo de armazenamento e desempenham um papel crucial na garantia da preservação desses recursos genéticos ao longo do tempo (Copeland e McDonald, 2012).

Tratando-se da qualidade das sementes, a regra de análise de sementes florestais no Brasil exige a realização de testes padrões antes do uso. Os testes padronizados comumente realizados são o teste de umidade que mede o teor de água das sementes; o teste de pureza física que avalia a proporção de sementes puras em relação a sementes inertes, materiais estranhos e sementes de outras espécies; o teste de tetrazólio para verificar viabilidade; o teste de germinação que determina a capacidade das sementes de produzir plântulas normais sob condições favoráveis; e o teste de vigor que avalia a capacidade das sementes de germinar sob condições adversas, como baixas temperaturas ou estresse hídrico (Brasil, 2013).

No entanto, exceto o teste físico, os demais testes são destrutivos e demandam prazos para obter os resultados, logo a inserção e o aprimoramento de tecnologias que permitam análises conclusivas e não destrutivas são cruciais na conservação de espécies nativas em que o acesso às sementes são escassos ou difíceis (Dell'aquila, 2007).

1.5.1 Qualidade via análise imagem raio-X

A técnica de radiografia na qualidade de sementes é um método não destrutivo utilizado para avaliar a integridade interna das sementes e identificar possíveis defeitos ou danos que não são visíveis externamente, a qual usa de radiação ionizante, como raios-X, para penetrar nas sementes e produzir uma imagem que revela sua estrutura interna (Van der Burg et al., 1994). A radiação eletromagnética tem um comprimento de onda que varia de 0,01 a 10 nanômetros. Os fótons de raios-X têm uma energia na faixa de 0,1 a 120 kiloelectron volts (keV), o que lhes confere uma alta capacidade de penetração, logo os raios-X que atravessam as sementes atingem um detector sensível (alvo metálico, como tungstênio), que os converte em sinais elétricos e esses sinais são processados e transformados em uma imagem radiográfica que é normalmente exibida em um monitor (Xia et al., 2019).

As imagens realizadas permitem detectar uma série de características que não são possíveis de ser identificadas a olho nu, como o teor de água relativo devido às variações na densidade das sementes; a viabilidade do embrião revelando se o mesmo está presente ou bem desenvolvido; a integridade e formação do endosperma; a presença de danos mecânicos, como rachaduras, quebras ou deformidades nas sementes; e a presença de insetos, fungos ou bactérias dentro das sementes indicando infestações ou contaminações (Gomes Junior e Duijn, 2017). Todos esses fatores podem afetar sua capacidade de germinação e o desenvolvimento caso as estruturas estejam ausentes ou danificadas (ISTA, 2003).

De acordo com a Regra Internacional de Análise de Sementes, para a análise radiográfica de sementes existem processos básicos que se iniciam com a preparação das mesmas para a radiografia. Isso envolve a assepsia dessas sementes, a fim de remover quaisquer resíduos que possam afetar a qualidade da imagem. Em seguida as sementes são organizadas em bandejas ou suportes de radiografia, garantindo uma distribuição uniforme e facilitando o posicionamento na máquina de radiografia. Dependendo do formato das sementes, é necessário ajustar o posicionamento para garantir que todas estejam na mesma posição e, uma vez corretamente posicionadas, as sementes são expostas à radiação ionizante (ISTA, 2003).

Pesquisas têm buscado relacionar a anatomia das sementes com a germinação ou morfologia das plântulas, cuja correspondência tem variado de acordo com a espécie. Dentre as espécies florestais em que se verificou tal correspondência destacam-se as sementes de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl (Machado e Cícero, 2003), *Xylopia aromatica* Lamarck. (Socolowski et al., 2011), *Platypodium elegans* Vog. (Gomes et al., 2016), *Leucaena leucocephala* Lam. (Medeiros et al., 2018), *Jatropha curcas* L. (Bianchini et al., 2021) e *Anadenanthera peregrina* L. Speg. (Pinheiro et al., 2022).

1.5.2 Criopreservação de sementes

A criopreservação de sementes fornece uma abordagem adicional para o armazenamento de germoplasma e na preservação da diversidade genética a longo prazo, protegido contra contaminação e com requisitos mínimos de espaço e manutenção (Stanwood, 1985). No entanto, a técnica requer um investimento inicial significativo de capital, técnicos especialmente treinados e um fornecimento regular de nitrogênio líquido (Benelli, 2021).

A criopreservação envolve a remoção de água do tecido, seja por secagem ou remoção ou substituição de água por meios químicos (dependendo do tipo de tecido), seguida de exposição ao nitrogênio líquido (NL) a -196°C (Engelmann e Dussert, 2012). As divisões celulares e os processos metabólicos cessam a esta temperatura, tornando possível o armazenamento a longo prazo (Vendrame, 2018). A quantidade de dessecação necessária para a criopreservação pode variar dependendo do sistema utilizado. No entanto, o rápido resfriamento envolvido no processo permite a vitrificação, que é a transição direta da água líquida para uma fase amorfa (vidro). Isso evita a formação de cristais de gelo prejudiciais (Engelmann e Dussert, 2012; Vendrame, 2018).

A técnica de vitrificação de plantas é empregada para a criopreservação de plantas menos resistentes ao frio ou não resistentes. As amostras são primeiro embebidas com uma concentração intermediária de solução crioprotetora (geralmente 2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose) e, em seguida, imergidas em uma solução de vitrificação de alta concentração (PVS) para desidratação. As amostras são então

resfriadas por imersão direta em nitrogênio líquido e, em seguida, rapidamente aquecidas em banho-maria (Merzougui et al., 2023).

As soluções de vitrificação de plantas projetadas por Sakai e Engelmann (2007) são amplamente utilizadas, especialmente PVS2 e PVS3. Uma solução de criopreservação é uma mistura especial de líquidos utilizados na criopreservação para manter células, tecidos ou órgãos em temperaturas muito baixas, promovendo a vitrificação, esse processo é a conversão direta da água em um estado amorfo sem a formação de cristais de gelo, que previne danos às células durante o congelamento. As soluções de acidificação geralmente contêm compostos crioprotetores, como glicerina, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol. ou polímero, protegendo as células dos efeitos negativos do congelamento, que podem incluir agentes osmóticos para ajustar o equilíbrio osmótico durante o procedimento (Merzougui et al., 2023).

A criopreservação de sementes de espécies florestais brasileiras sem o uso de soluções de vitrificação foi promissora para as espécies *Aegiphila ihotzkiana* Cham; *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. L.; *Anadenanthera macrocarpa* Benth.; *Bauhinia* sp.; *Cassia ferruginea* (Schrader.) Schrader Ex DC.; *Chorisia speciosa* St. Hil.; *Hymenae stignocarpa* Mart. ex Hayne; *Mimosa setosa* Benth.; *Platypodium elegans* Vog.; *Qualea parvilora* Mart. Warm.; *Roupala montana* Aubl.; *Sclerolobium aureum* (Tul.) Benth. (L.); *Tabebuia umbellata* (Sond./SandW) (Wetzel et al., 2003); *Astronium urundeuva* Engl.; *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Gonzaga et al., 2003); *Chorisia speciosa* St. Hil (Prudente et al., 2016); *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Freire et al., 2018); *Butia yatay* (Vargas et al., 2020); *Myracrodruon urundeuva* Allem.; *Astronium fraxinifolium* Schott. (Pereira et al., 2022); *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. (Entensa et al., 2022) e *Genipa americana* L. (Souza et al., 2023b).

Já o uso de soluções crioprotetoras foram aplicados na criopreservação de sementes quando essas não toleram o tratamento de frio direto (Ballesteros et al., 2021). De acordo, Yong et al. (2019) demonstraram que taxas mais altas de vitalidade e germinação de sementes foram obtidas usando PVS3 por 60 minutos em sementes de *Artemisia sieversiana* Ehrh. Ex Willd. O uso da solução PVS2, permitiu a melhor preservação de sementes de *Hylocereus costaricensis* (FAC Weber) Britton & Rose (Santana et al., 2024).

De acordo com Ferrari et al. (2016), o uso de glicerol 2M (20 min) + PVS2 com 1% de floroglucinol (10 min) em sementes de *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. manteve porcentagens mais altas de germinação, no entanto, não diferiu significamente da imersão direta no NL. O uso das soluções PVS1; PVS2; PVS2 + 1% de floroglucinol; e PVS3 não interferiu na germinação de *Astronium urundeuva* M. Allemão Engl., porém também não diferiu da imersão direta em NL (Paula et al., 2022). Todo esse esforço se destina a fortalecer a criopreservação, reconhecida como potencialmente o método mais seguro para a manutenção a longo prazo do germoplasma vegetativo e das sementes (Benelli, 2021).

1.4 REFERÊNCIAS

- Ahmad F, Bibi S, Kang M, Anees M, Ansar M, Alam MR, Kim SY, Wahedi HM (2020) Naphthoquinones from *Handroanthus impetiginosus* promote skin wound healing through Sirt3 regulation. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 23(9):1139.
- Aloo BN, Tripathi V, Makumba BA, Mbega ER (2022) Plant growth-promoting rhizobacterial biofertilizers for crop production: The past, present, and future. **Frontiers in Plant Science**, 13:1002448.
- Andrade LA, Santos CHB, Frezarin ET, Sales LR, Rigobelo EC (2023) Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Microorganisms**, 11(4):1088.
- Ansari RA, Mahmood I, Rizvi R, Sumbul A, Safiuddin A S (2017) Siderophores: augmentation of soil health and crop productivity. **Probiotics in agroecosystem**, 291-312.
- Ballesteros D, Fanega-Sleziak N, Davies RM (2021) Cryopreservation of seeds and seed embryos in orthodox-, intermediate-, and recalcitrant-seeded species. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, 663-682.
- Benelli, C (2021) Plant cryopreservation: A look at the present and the future **Plants**, 10(12):2744.
- Bettegowda RH, Nanjundappa A, Revanna A, Manchegowda HK, Ravi JE, Bagyaraj DJ (2021) Selected microbial consortia promote *Dalbergia sissoo* growth in the large-scale nursery and wastelands in a semi-arid region in India. **Journal of Forest Research**, 26(6):448-454.
- Bianchini VDJM, Mascarin GM, Silva LCAS, Arthur V, Carstensen JM, Boelt B, Barboza da Silva, C (2021) Multispectral and X-ray images for characterization of *Jatropha curcas* L seed quality. **Plant Methods**, 17:1-13.

Binder BM (2020) Ethylene signaling in plants. **Journal of Biological Chemistry**, 295(22) :7710-7725.

Bittencourt NS, Moraes CIG (2010) Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae): a histological study of postpollination events. **Plant Systematics and Evolution**, 288:59-76.

Brasil (2003) Lei nº 10711, de 5 de agosto de 2003. **Dispõe sobre as normas para a produção, comercialização e utilização de sementes**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 6 ago 2003 Seção 1, p. 1.

Brasil (2004) Decreto nº 5153, de 23 de julho de 2004 Regulamenta a Lei nº 10711, de 5 de agosto de 2003. **Dispõe sobre o controle da origem e destino de sementes e mudas, define responsabilidades, estabelece penalidades e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 jul 2004 Seção 1, p 1

Brasil (2013) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013: **Dispõe sobre os procedimentos e critérios técnicos para análise de sementes de espécies florestais** Brasília, DF.

Brasil (2017) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Instrução Normativa nº 17, de 26 de abril de 2017. **Estabelece as normas para a produção e comercialização de mudas de espécies florestais**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 27 abr 2017 Seção 1, p. 15.

Braverman I (2014) Conservation without nature: the trouble with *in situ* versus *ex situ* conservation. **Geoforum**, 51:47-57.

Cabanzo-Atilano I, Sandoval-Villa M, Almaraz-Suárez JJ, García-Cué JL, Pedraza-Santos ME, Peralta-Sánchez MG (2024) Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in the vegetative development of blackberries (*Rubus* spp) in greenhouse. **Chilean journal of agricultural research**, 84(1):70-83.

Campos TS, Patrício MP, Vieira GR, Souza AMBD, Santos CHB, Rigobelo EC, Pivetta, KFL (2023) Rhizobacteria in growth and quality of açai seedlings. **Ornamental Horticulture**, 29:208-215.

Candaten L, Dalla Costa HW, Trevisan R, Eloy E, Kulczynski SM (2020) Physical-mechanical properties and biological resistance of thermally modified juvenile *Handroanthus chrysotrichus* wood. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, 63(1):48-56.

Carvalho NM; Nakagawa J (2012) **Sementes: Ciência, tecnologia e produção** (5ª ed) FUNEP 590 p.

CBD (2022) Convention on Biological Diversity. Nations Adopt Four Goals, 23 Targets for 2030 in **Landmark UN Biodiversity Agreement**. 19 de Dezembro 2022. Disponível em: <https://prod.drupal.www.infra.cbd.int/sites/default/files/2022-12/221219-CBD-PressRelease-COP15-Final_0.pdf> Acesso em: 14 fev. 2024

Chandran H, Meena M, Swapnil P (2021) Plant growth-promoting rhizobacteria as a green alternative for sustainable agriculture. **Sustainability**, 13 (19):10986.

Chaves PMS, Silva JR, Braga MO, Marques NS, Freitas ADD (2018) Qualidade fisiológica de sementes e crescimento inicial de mudas de *Handroanthus impetiginosus* sob diferentes sombreamentos e substratos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 13(1):22-26.

Cochrane JA, Crawford AD, Monks LT (2007) The significance of *ex situ* seed conservation to reintroduction of threatened plants. **Australian Journal of Botany**, 55(3):356-361.

Copeland LO, McDonald MF (2012) **Principles of seed science and technology**. Springer Science & Business Media 3 ed., 409 p.

Crowley DE (2006) Microbial siderophores in the plant rhizosphere. **Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms**, 169-198.

Cunha FL, dos Santos JA, Diniz PC, Melo LA, Venturin N (2022) Uso de adubos de liberação lenta na produção de mudas de *Handroanthus impetiginosus*. **Advances in Forestry Science**, 9(4):1885-1891.

De-la-Peña C, Loyola-Vargas VM (2014) Biotic interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity. **Plant physiology**, 166(2):701-719.

Dell'acquila A (2007) Towards new computer imaging techniques applied to seed quality testing and sorting. **Seed Science and Technology**, 35(3):519-538.

Duan Y, Zhou Y, Li Z, Chen X, Yin C, Mao Z (2022) Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* QSB-6 on the growth of replanted apple trees and the soil microbial environment. **Horticulturae**, 8(1):83.

Merzougui SE, Benelli C, El Boullani R, Serghini MA (2023) The Cryopreservation of Medicinal and Ornamental Geophytes: Application and Challenges. **Plants**, 12(11):2143.

Engelmann F, Dussert S (2012) Cryopreservation In **Conservation of tropical plant species** New York, NY: Springer New York, 107-119.

Engelmann F, Engels JMM (2002) Technologies and strategies for *ex situ* conservation. **Managing plant genetic diversity**, 89-103.

Entensa, Y, González-Morales, A, Linares, C, Vázquez, JG, Martínez-Montero, M E, Zevallos-Bravo, BE, Lorenzo, JC (2022) Cryopreservation of seeds of the highly valued tropical timber species *Swietenia mahagoni* **Cryoletters**, 43(6):341-348.

Ferrari EAP, Colombo RC, Faria RTD, Takane RJ (2016) Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agrônômica**, 47:172-177.

Freire JNT, Alencar SDS, Passos TO, Matias JR, Silva FFS, Dantas BF (2018) Thawing methods and physiological quality of *Anadenanthera colubrina* seeds frozen at ultra-low temperature. **Informativo ABRATES**, 28(1):85-88.

Garcia DC, Barros ACSA, Peske ST, Menezes NLD (2004) A secagem de sementes. **Ciência Rural**, 34:603-608

Gomes Junior FG, Duijn BV (2017) Three-dimensional (3-D) X-ray imaging for seed analysis. **Seed Testing International**, (154):48-52.

Gomes KBP, Matos JMM, Martins IS, Martins RDCC (2016) X-ray test to evaluate the physiological potencial of *Platypodium elegans* Vog Seeds (Fabaceae). **Scientia Agropecuaria**, 7(3):305-311.

Gonzaga TWC, Mermc M, Silva H, Duarte MEM (2003) Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 5(2):145-154.

Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC (2016) Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, 2(1):1127500.

Gupta G, Parihar SS, Ahirwar NK, Snehi SK, Singh V (2015) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **J Microb Biochem Technol**, 7(2), 096-102.

Gupta S, Seth R, Sharma A (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria play a role as phytostimulators for sustainable agriculture. **Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture**, p. 475-493.

Hassan MK, McInroy JA, Kloepper JW (2019) The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: a review. **Agriculture**, 9(7), 142.

Hawkes JG, Maxted N, Ford-Lloyd BV (2012) **The ex situ conservation of plant genetic resources**. Springer Science & Business Media. Academic Publishers, Netherlands, 250 p.

Hmaeid N, Wali M, Mahmoud OMB, Pueyo JJ, Ghnaya T, Abdelly C (2019) Efficient rhizobacteria promote growth and alleviate NaCl-induced stress in the plant species *Sulla carnosa*. **Applied Soil Ecology**, 133:104-113.

ISTA (2003) International Seed Testing Association. **Rules for Seed Testing** Zurich: ISTA.

IUCN (2020) **The Red List of Threatened Species**. BGCI, Tree Specialist Group. *Handroanthus impetiginosus*. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/144297143/173394208> Acesso em: 20 Jan. 2024.

Kawano T (2003) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. **Plant cell reports**, 21:829-837.

Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN (1980) *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. **Current microbiology**, 4:317-320.

Kloepper JW, Schroth MN (1978) **Plant growth promoting rhizobacteria on radishes**. In Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Angers, France ed. Station de Pathologic Vegetal et Phytobacteriologic. v. 2, p. 879-882.

Kondo YR, Primon AP, Fioreze ACDCL, Cruz SPD (2020) Growth promotion of genetically improved *Pinus taeda* seedlings by inoculation with species of *Bacillus*. **Cerne**, 26:456-462.

Kondo YR, Cruz SP, Chanway C, Kaschuk G. (2024) **Inoculation of *Azospirillum Brasilense* or *Bacillus* Spp. improves root growth and nutritional quality of araucaria (*Araucaria Angustifolia*) seedlings**. 35. Disponível em SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4693232>

Kushwaha M, Mishra A, Shankar S, Goel D, Joshi S, Ram S (2024) Chapter 32 - Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agriculture: recent progress and challenges in: Srivastav AL, Grewal, Markandeya AS, Pham TD (Eds.) **Role of Green Chemistry in Ecosystem Restoration to Achieve Environmental Sustainability**, Advances in Pollution Research, p. 333-342.

Leite DM, Damasio JF, Mello VDS, Fernandes L, Karsburg IV (2017a) Determinação do número cromossômico de *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, 15(1):90:94.

Leite MDS, Freitas RMO, Leite TDS, Dombroski JLD, Santos Junior JH (2017b) Growth and morphological responses of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos seedlings to nitrogen fertilization. **Bioscience Journal**, 33(1):88-94.

Liu YM, Zheng F, Liu ZH, Lan HB, Cui YH, Gao TG, Roitto M, Wang AF (2022) Enhanced Root and Stem Growth and Physiological Changes in *Pinus bungeana* Zucc. Seedlings by Microbial Inoculant Application. **Forests**, 13(11):1836.

Loguerio LL, Silva ACM, Ribeiro DH, De Lima Cruz JMF, Soares ACF, Marbach PAS, De Souza JT (2023) Assessing the functional diversity of rhizobacteria from cacao by partitioning root and shoot biomasses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1-17.

Lohmann, LG (2015). **Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB112305>>.

Lohmann, LG (2018) Check-list das Bignoniaceae do estado de Mato Grosso do Sul. **Iheringia**, Série Botânica., 73:157–162.

Lohmann LG (2024) ***Handroanthus* in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB114068>>. Acesso em: 01 mar. 2024

Lorenzi H (2020) **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. v.1. 8th ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Luciano DO, Lima CA, Lopes MB, De Oliveira Moura DM, Ferreira ALL, Martins ALL, Junior AFC (2023) *Bacillus* e *Trichoderma* como promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Research, Society and Development**, 12(2):e11012239509.

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual review of microbiology**, 63:541-556.

Machado CF, Cícero, SM (2003) 'Aroeira-branca'[*Lithraea molleoides* (Vell) Engl-Anacardiaceae] seed quality evaluation by the X-ray test. **Scientia Agricola**, 60:393-397.

Mapa (2011) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 56, de 8 de dezembro de 2011. **Regulamenta a Produção, a Comercialização e a Utilização de Sementes e Mudanças de Espécies Florestais, Nativas e Exóticas**. Brasília: Mapa.

Mariano RL, Montagnini DL, Manuquian HA, Katchborian-Neto A, Cavallari PSSR, De Almeida SG (2022) Antileishmanial activity and chemical composition of hydroalcoholic extracts from different parts of *Handroanthus impetiginosus* (Ipê-Roxo). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 32(5):851-857.

Máximo WPF, Santos BR, Martins JPR, Beijo LA, Barbosa S (2020) Multiplication and in vitro rooting of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos. **Ciência Florestal**, 30:658-668.

Medeiros ADD, Araújo JDO, León MJZ, Silva LJD, Dias DCFDS (2018) Parameters based on X-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, 42:643-652.

Mendes-Rodrigues C, Caetano APDS, Sampaio DS, Pereira JM, Ribeiro-Oliveira JP, Oliveira PE, Ranal MA (2023) Gemellar Competition as a Key Component in Seed–Seedling Transition of *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex A. DC.) Mattos (Bignoniaceae). **Seeds**, 2(2):177-194.

Meneses CH, Rouws LF, Simões-Araújo JL, Vidal MS, Baldani JI (2011) Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Molecular plant-microbe interactions**, 24(12):1448-1458.

Monteiro P, Winagraski E, Auer C (2014) **Importância do uso de rizobactérias na produção de mudas florestais**. Comunicado técnico, 338, Colombo: Embrapa Florestas, 6p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1010557>. Acesso em: 13 Jan. 2022.

Nayak SK, Nayak S, Patra JK (2020) Rhizobacteria and its biofilm for sustainable agriculture: a concise review. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: microbial biofilms**, 165-175.

Oliveira Junior JC, Rodrigues MCS, Oliveira E, Souza FML, Dal Bem EA (2020) Enraizamento de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) via miniestaquia sob diferentes dosagens do extrato de *Cyperus rotundus*. **Brazilian Journal of Development**, 6(12):102703-102713.

Oliveira, MC D., Ogata RS, Andrade GA, Santos DDS, Souza RM, Guimarães TG, Ribeiro JF (2016) **Manual de viveiro e produção de mudas: espécies arbóreas nativas do Cerrado**. Editora Rede de Sementes do Cerrado, 124 p. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1042301/1/ManualdeViveiroeproducaodemudas.pdf>. Acesso em: 13 Jan. 2023. Acesso em: 20 Jan. 2024.

Orozco-Mosqueda M, Glick BR, Santoyo G (2020) ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. **Microbiological Research**, 235:126439.

Patel JJ (1969) Micro-organisms in the rhizosphere of plants inoculated with *Azotobacter chroococcum*. **Plant and Soil**, 31:209-223.

Paula JCBD, Guariz HR, Ribeiro Júnior WA, Shimizu GD, Faria RTD, Oliveira HCD (2022) Cryopreservation of seeds of the Brazilian native species Aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva* M. Allemão Engl.). **Revista Caatinga**, 35:915-924.

Pereira CDFCP, Luz PB, da Silva Júnior MA, Sobrinho SP, de Medeiros, CM, Sander NL (2022) criopreservação de sementes do pantanal. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, 19(1):01-14.

Pimenta JMA, Souza WMATD, Ferrari CDS, Vieira FDA, Fajardo CG, Pacheco MV (2023) Selection of *Handroanthus impetiginosus* mother trees to support seed collection areas. **Revista Árvore**, 47:e4706.

Pinheiro DT, Medeiros ADD, Soares TFSN, Capobianco NP, Dias DCFDS (2022) Image analysis using X-ray to evaluate seed quality of *Anadenanthera peregrina* (L) Speg. **Ciência Florestal**, 32:1309-1322.

Prado RM (2020) **Nutrição de plantas**. 2nd ed. São Paulo; Editora Unesp Digital.

Prudente DO, Nery FC, Silva LS, Paiva R, Reis MV, Nery MC (2016) Germinação in vitro e criopreservação de sementes de paineira-rosa. **Scientia Agraria Paranaensis**, 15(3):272-276.

Puri A, Padda KP, Chanway CP (2017) **Beneficial effects of bacterial endophytes on forest tree species**. Endophytes: Crop Productivity and Protection: Springer v. 2, p. 111-132.

Qian T, Ye JR (2020) The mechanism of dissolving inorganic phosphorus by *Bacillus megaterium* ZS-3 and its growth promotion of *Cinnamomum camphora*. **Biotechnology Bulletin**, 36(8):45.

Rabaiolli SMDS, Reiniger LRS, Stefanell CM, Silva KBD, Paim AF, Ziegler ACDF (2017) Agar does not affect in vitro rhizogenesis and ex vitro acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. **Cerne**, 23, 185-192.

Rahmatullah M, Samarraie W, Jahan R, Rahman S, Sharmin N, Miajee EU, Chowdhury MH, Bari SBM, Azad AABMA, Ahsan SK (2010) An ethnomedicinal, pharmacological and phytochemical review of some Bignoniaceae family plants and a description of Bignoniaceae plants in folk medicinal uses in Bangladesh. **Advances in natural and applied sciences**, 4(3):236-253.

Rezende GP, Oliveira Gonçalves E, Faria JCT, Caldeira MVW, Avelar MLM, Momolli DR (2023) Substratos formulados com biossólido e casca de ovo na produção de mudas de *Handroanthus chrysotrichus*. **Nativa**, 11(3):338-347.

Riaz U, Murtaza G, Anum W, Samreen T, Sarfraz M, Nazir MZ (2021) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers and biopesticides. In: Hakeem KR, Dar GH, Mehmood MA, Bhat RA (Eds.) **Microbiota and biofertilizers: a sustainable continuum for plant and soil health**, Cham: Springer International Publishing, p. 181–196.

Ribeiro ASN, Junior AFC, Chagas LFB, Martins ALL, De Almeida LB, Nobrega GS, Alves MVG (2023) Efficiency of *Trichoderma* and *Bacillus subtilis* as growth promoters in eucalyptus *Corymbia citriodora*. **Observatório de la Economía Latinoamericana**, 21(11):20380-20397.

Ronquim CC, Alvarez IA, Cipriani HN, Simonetti JC (2020) **Avaliação dos viveiros produtores de mudas florestais nativas de Rondônia**. Campinas: Embrapa Territorial, 35 p. Disponível em: https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/7515/1/RP_Diagn%c3%b3stico_2015.pdf. Acesso em: 13 Jan. 2024.

Rotach P (2005) *In situ* conservation methods. **Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe**. Arbora, Zvolen, Slovakia, 535-565.

Sakai A, Engelmann F (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, 28(3):151-172.

Sampaio DS, Costa ME, Mendes-Rodrigues C (2013) Temperature effect in the number of seedlings per seed in cultivated specimens of *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae). **Iheringia, Série Botânica**, 68(2):279-283.

Santana BÍD, Paiva R, Reis MVD, Vilas-Boas LV, Matos EM Campos, JMDS (2024) Seed cryopreservation without vitrification (PVS2) induces oxidative stimuli to promote endoreplication in red pitaya seedlings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 156(1):11.

Santos LCD, Azevedo LS, Siqueira EPD, Castro AHF, Lima LARDS (2024) Chemical characterization, antioxidant activity, and cytotoxicity of fatty acids methyl esters from *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) seeds. **Natural Product Research** 38(4):619-623.

Santos SR (2017) A atual classificação do antigo gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae), sob o ponto de vista da anatomia da madeira. **Balduinia**, 58:10-24.

Santoyo G, Urtis-Flores CA, Loeza-Lara PD, Orozco-Mosqueda MDC, Glick BR (2021) Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Biology**, 10(6):475.

São José JFB, Hernandez MAS, Volpiano CG, Lisboa BB, Beneduzi A, Bayer C, Vargas LK (2023) Diversity of rhizobia, symbiotic effectiveness, and potential of inoculation in *Acacia mearnsii* seedling production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 54(1):335-348.

Scremin-Dias E, Kalife C, Menegucci ZRH, Souza PR (2006) **Produção de mudas de espécies florestais nativas**: manual. Rede de sementes do Pantanal, Serie 2, Campo Grande, MS:Ed. UFMS, 59 p.

Seneviratne G, Weerasekara MLM, Seneviratne KACN, Zavahir JS, Kecskés ML, Kennedy IR (2011) Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action. In: Maheshwari D (Eds) **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**. Microbiology Monographs, vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 81-95.

Shah AMUH, Ditta A, Parveen A, Thind S, Ebadi AG (2022) Transcription factors that scavenge reactive oxygen species in rhizobacteria. In: **Sustainable Plant Nutrition under Contaminated Environments**, p. 235-256.

Silva APMD, Marques HR, Santos TVMND, Teixeira AMC, Luciano MSF, Sambuichi RHR (2015) **Diagnóstico da produção de mudas florestais nativas no Brasil**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea), Brasília, 58 p. Disponível em: https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/7515/1/RP_Diagn%c3%b3stico_2015.pdf. Acesso em: 20 Jan. 2024.

Silva-Junior OB, Grattapaglia D, Novaes E, Collevatti RG (2018) Genome assembly of the Pink Ipê (*Handroanthus impetiginosus*, Bignoniaceae), a highly valued, ecologically keystone Neotropical timber forest tree. **Gigascience**, 7(1):gix125.

Singh M, Singh D, Gupta A, Pandey KD, Singh PK, Kumar A (2019) Plant growth promoting rhizobacteria: application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens. In: Singh AK, Kumar A, Singh PK **PGPR amelioration in sustainable agriculture**, Woodhead Publishing, p. 41-66.

Smith BE, Richards RL, Newton WE (2013) **Catalysts for Nitrogen Fixation: Nitrogenases, Relevant Chemical Models and Commercial Processes**; Springer Science & Business Media: Berlin, Germany, v. 1, p. 340.

Socolowski F, Cicero SM, Vieira DCM (2011) Seed weight of *Xylopia aromatica* (Annonaceae): quality evaluation from X-ray and seedling emergence. **Scientia Agricola**, 68:643-646.

Son JS, Sumayo M, Hwang YJ, Kim BS, Ghim SY (2014) Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. **Applied soil ecology**, 73:1-8.

Souza ADG, Smiderle OJ, Maia SDS, Dias TJ (2023a) Do *Azospirillum brasilense* application methods and doses influence the quality of *Cordia alliodora* seminal seedlings?. **Scientia Forestalis**, 51, e3971.

Souza RRD, Paiva PDDO, Freitas RTD, Silva DPCD, Reis MVD, Nery FC, Paiva R (2023b) Cryopreservation of *Genipa americana* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, 54, e20228531.

Stanwood PC (1985) Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation in: In: Kartha KK (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**, CRC Press: Boca Raton p.199-226.

Su F, Zhao B, Dhondt-Cordelier S, Vaillant-Gaveau N (2024) Plant-growth-promoting rhizobacteria modulate carbohydrate metabolism in connection with host plant defense mechanism. **International Journal of Molecular Sciences**, 25(3):1465.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2017) **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 6th ed.888 p.

Trapet P, Avoscan L, Klinger A, Pateyron S, Citerne S, Chervin C, Mazurier S, Lemanceau P, Wendehenne D, Besson-Bard A (2016) The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. **Plant Physiology**, 171(1):675-693.

UL Hassan T, Bano A (2015) The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 15(1):190-201.

Valle ACV, Carvalho AC, Rahme SW, Araújo ADRB, Malard PF, Brunel HSS (2023) Evaluation of cell viability and nitric oxide release after treatment of human hepatocellular carcinoma cells with a homeopathic compound of Graviola (*Annona muricata*) and Purple Ipe (*Handroanthus impetiginosus*) **Medical Research Archives**, 11(7):1-6.

Van der Burg WJ, Jalink H, Van Zwol RA, Aartse JW, Bino RJ (1994) **Non-destructive seed evaluation with impact measurements and X-ray analysis** In: International Symposium on Agrotechnics and Storage of Vegetable and Ornamental Seeds 362 (pp. 149-158).

Vargas DP, Ferreira LV, Taniguchi M, Coradin JH, Dutra LF (2020) Criopreservação de uma espécie de butiá ameaçada de extinção. **Rodriguésia**, 71:e00972018.

VB AB, VT A, Thomas B (2015) Ethno-pharmacological potentialities of some ornamental plants in the family Bignoniaceae. **Journal of Medicinal Plants Studies**, 3, 135-140.

Vendrame WA (2018) Cryopreservation. **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses Methods and Protocols**, p. 283-302.

Viana JVS, Fiedler NC, Capetine TB, Honorio APA, Ramalho AHC (2019) Sobrevivência e crescimento inicial de espécies arbóreas em áreas degradadas. **Agropecuária Científica no Semiárido**, 15(2):139-143.

Volis S, Blecher, M (2010) Quasi in situ: a bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants. **Biodiversity and conservation**, 19:2441-2454.

Wetzel M, Reis RB, Ramos KM (2003) **Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas**. Circular Técnica 26> Disponível em: <<https://www.infotecacnpiaembrapabr/bitstream/doc/185061/1/ct026pdf>> Acesso: 08 mar 2024.

WFO (2024) ***Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos**. Disponível em: <<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000778595>>. Accessed on: 08 Mar 2024

Xia Y, Xu Y, Li J, Zhang C, Fan, S (2019) Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: A review Artificial. **Intelligence in Agriculture**, 1:35-47.

Yong SH, Park D, Yang WH, Seol Y, Choi E, Jeong MJ, Choi MS (2019) Cryopreservation of sievers wormwood (*Artemisia sieversiana* Ehrh. Ex Willd.) seeds by vitrification and encapsulation. **Forest Science and Technology**, 15(4):180-186.

Yu C, Lv J, Xu H (2024) Plant growth-promoting fungi and rhizobacteria control *Fusarium* damping-off in Mason pine seedlings by impacting rhizosphere microbes and altering plant physiological pathways. **Plant and Soil**, 1-17.

Zegeye, H (2017) *In situ* and *ex situ* conservation: complementary approaches for maintaining biodiversity. **International Journal of Research in Environmental Studies**, 4(1):1-12.

Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Paré PW (2007) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. **Planta**, 226:839-851.

Zhu Y, Wang Y, He X, Li B, Du S (2023) Plant growth-promoting rhizobacteria: A good companion for heavy metal phytoremediation. **Chemosphere**, 338:139475.

CAPÍTULO 2 – Rizobactérias incrementam o crescimento e a qualidade das mudas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. Ex DC.) Mattos

2.1 RESUMO

Popularmente conhecida como ipê-amarelo, *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos é uma arbórea nativa do Brasil, de florescimento exuberante, usada na arborização de cidades, no reflorestamento de áreas degradadas, além de sua madeira ser destinada para diversos fins. Para o desenvolvimento de plantas vigorosas após o plantio, é importante a produção de mudas de alta qualidade, que podem ser obtidas com o uso de rizobactérias. Consideradas como fontes renováveis, as rizobactérias apresentam propriedades de promoção do crescimento, facilitadoras da absorção e/ou solubilização de nutrientes e contribuem para a produção de fitohormônios, ao mesmo tempo que podem atuar como controladoras de patógenos e na mitigação de estresse abiótico. Esses atributos juntos possibilitam o estabelecimento de um sistema de produção sustentável para a obtenção de mudas vigorosas e de crescimento rápido. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas na produção de mudas de ipê-amarelo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os tratamentos consistiram nos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Azospirillum brasilense* mais a ausência de microrganismos – controle; em quatro repetições e dez plantas por parcela. Os parâmetros avaliados foram: altura da parte aérea; diâmetro do coleto; comprimento do sistema radicular; massa seca da parte aérea, das raízes e total; número de folhas e área foliar, além do teor de clorofila; fluorescência mínima e máxima; e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II; razão altura da parte aérea/diâmetro do coleto e o Índice de Qualidade de Dickson. A inoculação de *B. amyloliquefaciens* promoveu incremento na altura da muda, no diâmetro do coleto, no comprimento de raiz, na área foliar, na massa seca da parte aérea, das raízes e total e, também, aumentou o Índice de Qualidade de Dickson. Pode-se concluir que *B. amyloliquefaciens* é o inoculante mais eficiente para a produção de mudas de ipê-amarelo, seguido por *A. brasilense*.

PALAVRAS-CHAVE: *Azospirillum brasilense*; *Bacillus* spp.; Microrganismos promotores de crescimento de plantas.

2.2 INTRODUÇÃO

A espécie *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos, popularmente conhecida no Brasil como ipê-amarelo, pertencente à Bignoniaceae, é nativa de ampla distribuição geográfica, presente nos biomas Cerrado, Mata Atlântica e Pampa, sendo de alto valor econômico, muito empregada na arborização urbana e na recuperação de áreas degradadas, além de apresentar madeira de alta densidade, muito procurada na construção civil e movelarias, podendo ser cultivada em sistemas integrados, tais como Integração Lavoura Pecuária Floresta (ILPF) e consorciada com outras espécies

em Sistemas Agroflorestais (SAFs) (Oliveira Junior et al., 2020; Flora e Funga do Brasil, 2024).

Neste contexto, a fim de atender a demanda para plantios, seja no meio urbano, em áreas de recuperação ou em sistemas integrados, há a necessidade de redução do tempo de viveiro, proporcionado pelo crescimento e desenvolvimento mais rápido das mudas e que essas sejam de boa qualidade, visando melhor desempenho no campo após o plantio. Este maior crescimento e qualidade das mudas pode ser obtido com o uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas (Monteiro et al., 2014).

As rizobactérias têm se mostrado eficazes na agricultura, promovendo o crescimento das plantas. Essas bactérias possuem diversos atributos que contribuem para o crescimento das plantas. Esses atributos incluem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e solubilizar fosfato no solo, a produção de sideróforos para aquisição de ferro, atividade de ACC desaminase auxiliando na tolerância ao estresse e a produção do fitohormônio ácido indol-3-acético (AIA) (Gupta et al., 2015; Chandran et al., 2021). Além disso, elas promovem indiretamente o crescimento das plantas controlando patógenos por meio da competição por nutrientes e espaço, da produção de substâncias antibióticas e da indução de mecanismos de defesa nas plantas (Riaz et al., 2021; Zhu et al., 2023).

Vários autores relataram resultados positivos em relação à promoção do crescimento e melhoria de diferentes espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* (Santos et al., 2021; Campos et al., 2023; Kondo et al., 2020), *Bacillus amyloliquefaciens* (Zhao et al., 2016; Rios et al., 2018; Gamez et al., 2019) e *Azospirillum brasilense* (Gonzalez et al., 2018; Kondo et al., 2024).

Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de rizobactérias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Azospirillum brasilense*) no crescimento e qualidade de mudas de ipê-amarelo (*H. chrysotrichus*).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O Experimento foi conduzido de setembro de 2021 a janeiro de 2022, em casa de vegetação, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), Câmpus de Jaboticabal, SP, cujas coordenadas são: Latitude: 21°14'45" S, Longitude:

48°18'58" O e Altitude: 595 m. O clima da microrregião, pelo sistema de Köppen-Geiger, foi o Aw - tropical de savana, com inverno seco e, pelo sistema de Thornthwaite, mostra a região com clima úmido e pequena deficiência hídrica no inverno (Andre e Garcia, 2015).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os tratamentos consistiram na presença de quatro microrganismos (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Azospirillum brasilense*) mais a ausência de microrganismos – controle, com quatro repetições e dez plantas por parcela.

As sementes de ipê-amarelo foram colhidas de matrizes existentes no Viveiro Experimental de Plantas Ornamentais e Florestais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV) em setembro de 2021 e semeadas em tubetes com capacidade volumétrica de 280 cm³ acondicionados em bandejas de polipropileno com capacidade para 54 recipientes, contendo como substrato comercial Carolina Soil®, composto por turfa, vermiculita, casca de arroz torrefada, calcário dolomítico calcinado, fertilizante NPK 14-16-18 e micronutrientes (informações obtidas a partir de dados existentes na embalagem). As bandejas foram suspensas em bancadas de malhas metálicas a 70 cm do solo, em casa de vegetação coberta e com as laterais protegidas com tela preta que permite a passagem de 50% da luz e, ainda, com cobertura de plástico transparente acima da cobertura de tela.

Foram distribuídas três sementes por tubete e, após a emergência, foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma plântula por recipiente, utilizando-se como critério a plântula de maior vigor e mais centralizada. A irrigação das mudas foi realizada por meio de microaspersores acionados automaticamente três vezes ao dia com duração de 15 minutos cada, com vazão de 30 L h⁻¹.

Os microrganismos utilizados fazem parte da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Produção Vegetal da UNESP-FCAV, Câmpus de Jaboticabal, onde foram produzidos separadamente, em meio de caldo nutritivo por sete dias em frascos mantidos em B.O.D. (Eletrolab, modelo 347 F, Brasil), à temperatura de 25 °C. Após o período de incubação, os microrganismos foram centrifugados separadamente a 10.000 rpm durante 10 minutos a 28 °C (Novatecnica, modelo MLW K24, Brasil). A concentração do inóculo foi padronizada conforme recomendação de Barry e Thornsberry (1991) e Sahm e Washington (1991)

em 1×10^7 UFC mL⁻¹ com auxílio de espectrofotômetro (Micronal, modelo B382, Brasil) na absorbância de 695 nm.

A inoculação dos microrganismos foi realizada duas vezes, uma aos 30 dias após a semeadura e outra aos 60 dias após a semeadura, por meio da aplicação de 1,0 mL da solução no substrato próximo ao caule, com o auxílio de micropipeta mecânica (VF-1000, Digipet®). As mudas destinadas ao tratamento controle não foram inoculadas.

Quando as raízes começaram a aparecer na base inferior dos tubetes foram avaliadas as características: altura da parte aérea (H, cm), medida a partir do nível do substrato até o ápice da última folha com o auxílio de régua milimetrada; diâmetro do coleto (DC, mm), determinado ao nível do substrato, com uso de paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Western® PRO DC-6); comprimento do sistema radicular (CR, cm), levando em consideração o comprimento da maior raiz, obtido com o auxílio de régua milimetrada; massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR), obtidas após a secagem em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C até atingir peso constante, sendo posteriormente pesadas em balança de precisão de 0,001g (SHIMADZU®, modelo AY220) e os resultados expressos em gramas; massa seca total (MST), obtida somando-se as massas secas da parte aérea e das raízes; contagem do número de folhas totalmente expandidas (NF) e área foliar (AF, cm²), utilizando medidor eletrônico de área foliar (Li-3100C, LI-COR®, Lincoln, Nebraska, USA).

Foi determinado o teor de clorofila, com o aparelho ClorofiLOG, modelo CFL1030, marca FALKER®; fluorescência mínima (Fo), fluorescência máxima (Fm) e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm), obtidos pelo fluorômetro portátil (OS30p, Opti Science).

Determinou-se também, a razão altura da parte aérea/diâmetro do coleto (H/DC) e o Índice de Qualidade de Dickson (IQD), obtido pela fórmula proposta por Dickson em 1960, aplicada em várias pesquisas, como descrita em Souza et al. (2022), onde:
$$IQD = \frac{MST \text{ (g)}}{[H \text{ (cm)} / DC \text{ (mm)} + MSPA \text{ (g)} / MSR \text{ (g)}]}$$

Foi realizada, ainda, a contagem de bactérias no substrato, raízes e parte aérea, nos tratamentos onde se realizou a aplicação das rizobactérias, a fim de observar a mobilização das mesmas após a inoculação.

A contagem de bactérias presentes no substrato foi realizada em dez gramas, que foram adicionados a um frasco Erlenmeyer contendo 95 mL de solução salina de pirofosfato de sódio 0,1%. Todos os frascos Erlenmeyer foram agitados por 1 hora e, do conteúdo dos frascos foram preparadas diluições em série seguindo a metodologia proposta por Wollum (1983). Cem microlitros (100 µL) das soluções obtidas por diluição foram inoculados em placas de Petri contendo meio ágar nutriente ou ágar batata dextrose em triplicata. Em seguida, as placas foram mantidas em estufa BOD a 30 °C, e o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi contado após 24, 48 e 72 horas (Vieira e Nahas, 2005).

Para a contagem de bactérias nas plantas, estas foram separadas em folhas e raízes e lavadas com água corrente. Para eliminação de microrganismos epifíticos, um grama (1 g) de cada tecido vegetativo (folhas e raízes) foi submetido à desinfecção superficial. Ambos os tecidos foram imersos sequencialmente em etanol 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio (2.0-2.5% Cl ativo) por 3 minutos e etanol 70% por 30 segundos. Posteriormente, os tecidos foram lavados três vezes com água destilada (Araújo et al., 2002). Uma vez lavados e esterilizados, os tecidos foram macerados assepticamente com o auxílio de um matraz e pilão e, em seguida, foram realizadas diluições e, alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar triptona soja para isolamento de bactérias. Essas placas foram cultivadas em estufas microbiológicas à temperatura constante de 30 °C durante 24 horas para crescimento de bactérias e a contagem do número de UFC foi realizado após 24, 48 e 72 horas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o Software AgroEstat (Barbosa e Maldonado Junior, 2015).

2.4 RESULTADOS

As plantas inoculadas com as bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* e *Azospirillum brasilense* apresentaram médias mais altas para altura da parte aérea, massa seca das raízes e massa seca total; os valores médios entre elas foram de 12,03 cm, 0,607 g e 0,913 g, respectivamente. Não houve diferenças no diâmetro do coleto e no comprimento das raízes entre *B. amyloliquefaciens*, *A. brasilense* e

Bacillus megaterium. Assim, a rizobactéria *B. amyloliquefaciens* foi a que apresentou as maiores médias massa seca da parte aérea (0,342 g), seguida por *A. brasilense*. Não houve diferença entre o controle e *Bacillus subtilis* para os parâmetros de crescimento (Figura 1.1).

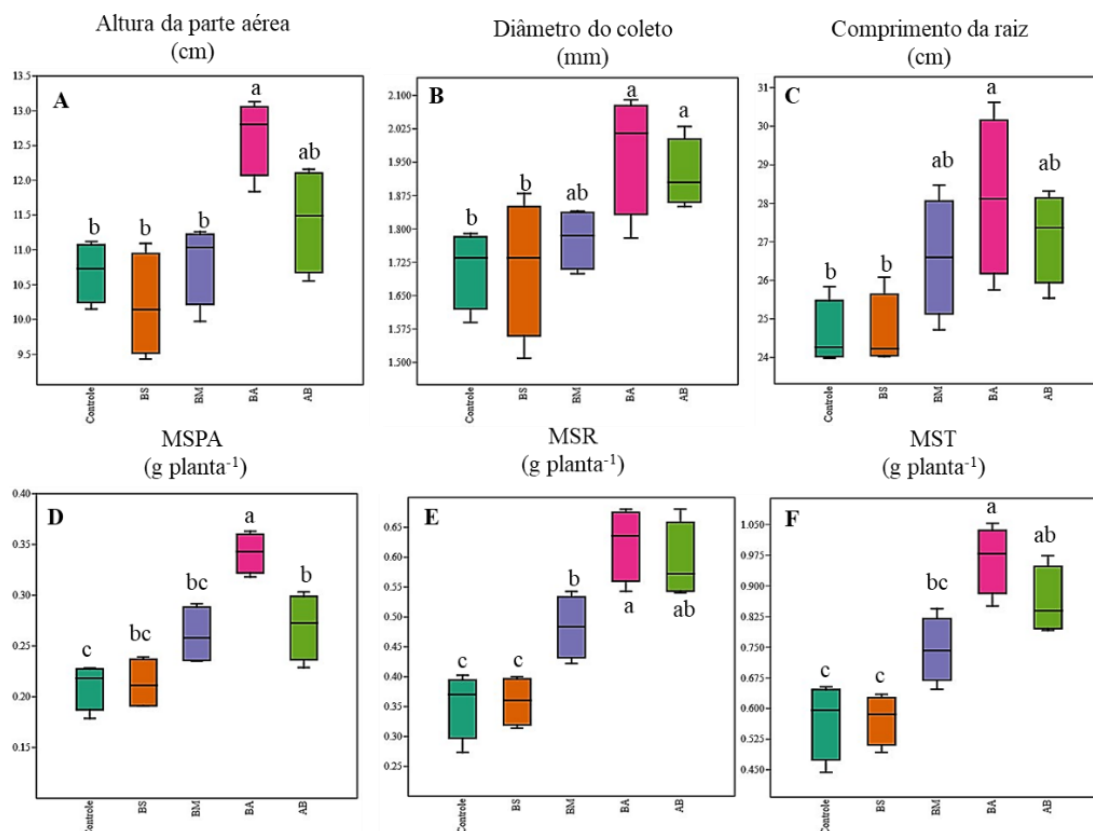


Figura 1.1. Boxplots para avaliação do crescimento de mudas de *Handroanthus chrysotrichus* inoculadas com as rizobactérias *Bacillus subtilis* (BS), *Bacillus megaterium* (BM), *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) e *Azospirillum brasilense* (AB), e sem inoculação – Controle, **A** - altura da parte aérea (cm), **B** - diâmetro do coleto (mm), **C** - comprimento da raiz (cm), **D** - massa seca da parte aérea (MSPA), **E** - massa seca de raízes (MSR), **F** - massa seca total (MST). Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Jaboticabal, SP, 2022.

B. amyloliquefaciens mostrou-se eficaz no crescimento quando comparado ao controle, promovendo ganhos de 18,3% na altura da parte aérea, 15,3% no diâmetro do caule, 14,5% no comprimento das raízes, 62,1% na massa seca da parte aérea, 76,2% na massa seca das raízes e 68,7% na massa seca total. Para *A. brasilense*, os ganhos em comparação com o controle foram de 6,9% para altura da parte aérea, 12,3% para diâmetro do caule, 10,4% para comprimento das raízes, 27,7% para

massa seca da parte aérea, 67,1% na massa seca das raízes e 50,4% na massa seca total. A rizobactéria *B. megaterium* mostrou ganhos de 8,2% no comprimento das raízes, 23,6% na massa seca da parte aérea, 36,5% na massa seca das raízes e 30% na massa seca total em comparação com o controle.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para número de folhas, teor de clorofila e relação Fv/Fm (Figura 1.2). Para área foliar, a espécie *B. amyloliquefaciens* teve a média mais alta, 60,2 cm²; o ganho na área foliar a partir da inoculação foi de 215% em comparação com o controle. Para F₀ e F_m, *B. amyloliquefaciens* e *A. brasilense* tiveram os maiores valores médios, 114; 476 e 114; 439, respectivamente.

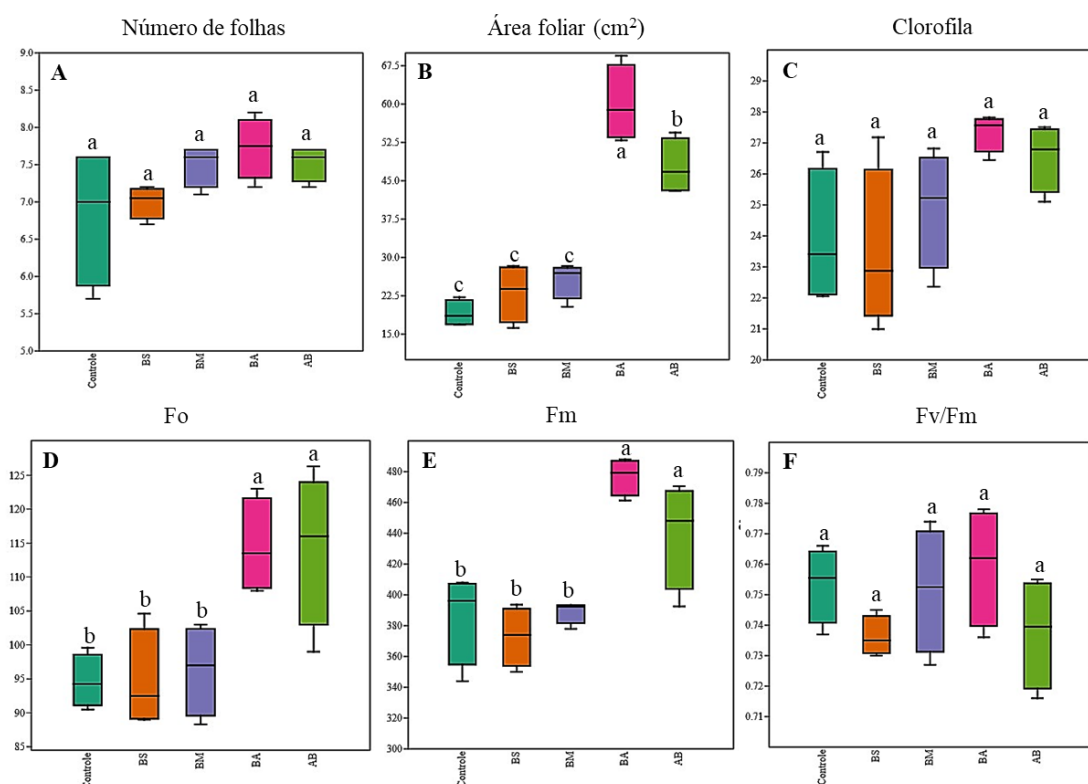


Figura 1.2. Boxplots para avaliação do desempenho fotossintético de mudas de *Handroanthus chrysotrichus* inoculadas com rizobactérias, **A** – número de folhas, **B** – área foliar, **C** - clorofila, **D** - fluorescência mínima (F₀), **E** - fluorescência máxima (F_m), **F** - máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm). Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Controle; *Bacillus subtilis* (BS), *Bacillus megaterium* (BM), *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) e *Azospirillum brasilense* (AB). Jaboticabal, SP, 2022.

Não houve diferença significativa na relação H/DC. Para o IQD, *B. amyloliquefaciens* e *A. brasilense* apresentaram as médias mais altas, 0,142 e 0,140,

respectivamente (Figura 1.3). O ganho médio de IQD usando *B. amyloliquefaciens* e *A. brasilense* em comparação com o controle foi de 70,2%.

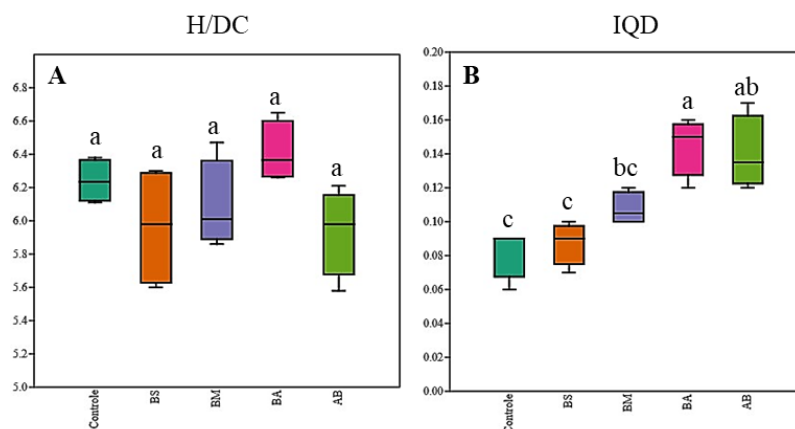


Figura 1.3. Boxplots para avaliação da qualidade de mudas de *Handroanthus chrysotrichus* inoculadas com rizobactérias, **A** - razão altura da parte aérea pelo diâmetro do coleto (H/DC), **B** - Índice de Qualidade de Dickson (IQD). Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Controle; *Bacillus subtilis* (BS), *Bacillus megaterium* (BM), *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) e *Azospirillum brasilense* (AB). Jaboticabal, SP, 2022.

Quanto à contagem de bactérias no substrato, o maior número foi observado para *B. amyloliquefaciens* ($9,34 \times 10^6$) e *A. brasilense* ($8,35 \times 10^6$), seguido por *B. megaterium* (Figura 1.4). O número de colônias de bactérias nas raízes foi maior quando *B. amyloliquefaciens* ($4,77 \times 10^4$) foi inoculado, seguido por *B. megaterium* ($4,18 \times 10^4$). Para as partes aéreas, o número foi maior para *B. amyloliquefaciens* ($8,61 \times 10^3$).

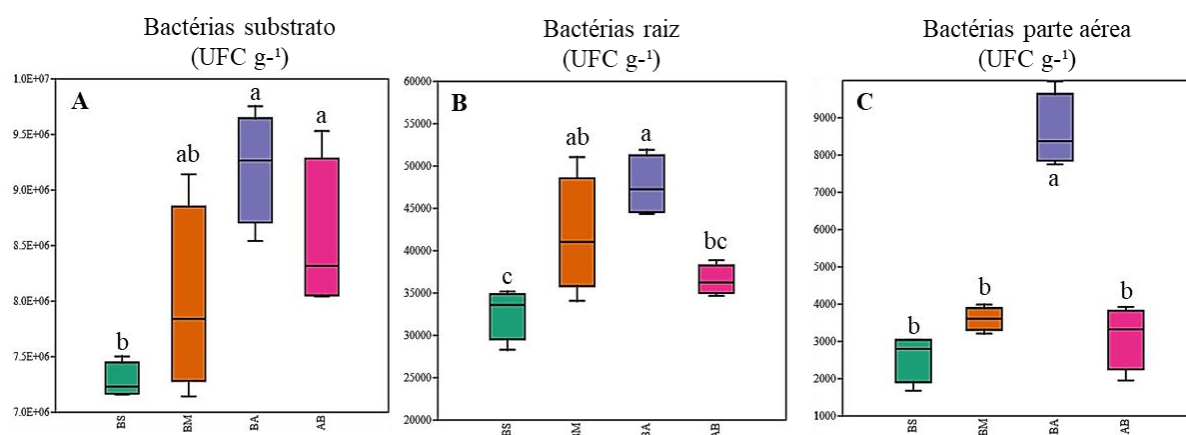


Figura 1.4. Boxplots para contagem de bactérias em mudas de *Handroanthus chrysotrichus* inoculadas com rizobactérias, **A** - UFC no substrato, **B** - UFC na raiz, **C** - UFC na parte aérea. Médias seguidas da mesma letra

minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Controle; *Bacillus subtilis* (BS), *Bacillus megaterium* (BM), *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) e *Azospirillum brasilense* (AB), Unidade formadoras de colônias por grama (UFC g⁻¹) Jaboticabal, SP, 2022.

É possível observar através da Figura 1.5 o aspecto visual das mudas de ipê-amarelo, de todos os tratamentos, aos 107 dias após a semeadura, sendo nítida a superioridade da rizobactéria *B. amyloliquefaciens*.

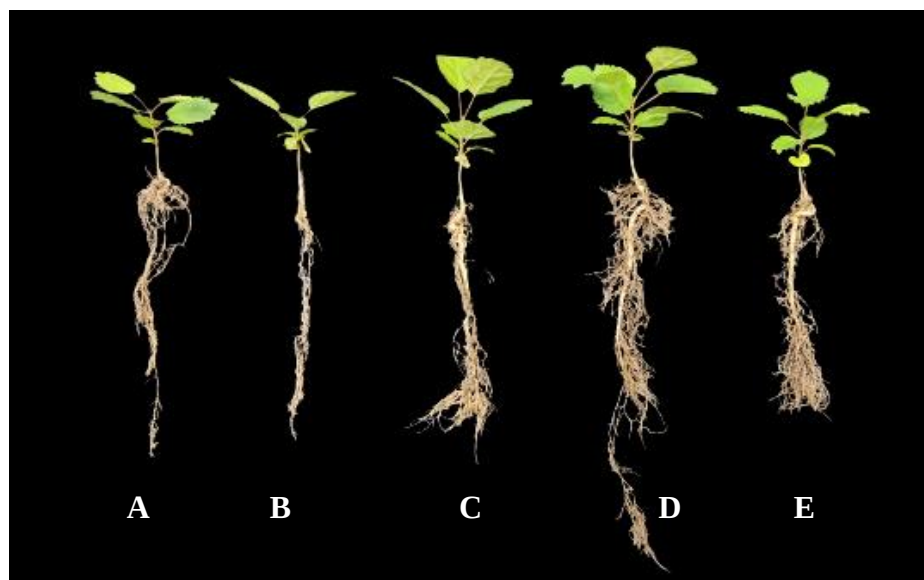


Figura 1.5. Mudanças de *Handroanthus chrysotrichus* aos 107 dias após a semeadura. Controle (A) *Bacillus subtilis* (B), *Bacillus megaterium* (C), *Bacillus amyloliquefaciens* (D) e *Azospirillum brasilense* (E). Jaboticabal, SP, 2022.

2.5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, as rizobactérias promotoras do crescimento das plantas (RPCP) têm recebido significativa atenção devido à sua capacidade de melhorar o crescimento das plantas. Para a agricultura sustentável, a diversidade microbiana do solo é fomentada por práticas que aumentam a mobilização de nutrientes, a solubilização e a supressão de doenças (Kumari et al., 2019). No entanto, a aplicação prática dessas bactérias benéficas, às vezes falha, devido à sua incapacidade de colonizar a rizosfera das plantas inoculadas, então a colonização das raízes pelas cepas inoculadas parece ser um passo essencial na interação entre as bactérias benéficas e as plantas hospedeiras (Ahemad e Kibret, 2014). Uma prática envolve a introdução de bactérias benéficas no solo usando inoculantes microbianos, que

podem ser baseados em inoculantes de espécies únicas ou várias espécies de PGPRs e podem ser usados para aumentar a disponibilidade e a absorção de nutrientes minerais, aumentar a resistência à doenças de plantas e reduzir o estresse abiótico para promover um crescimento mais saudável das plantas (Santoyo et al., 2021).

O estudo demonstrou que as mudas de ipê-amarelo tiveram respostas significativas à inoculação de rizobactérias, especialmente com a *Bacillus amyloliquefaciens*, onde foram observadas as maiores médias em altura da parte aérea (12,03 cm), diâmetro do caule (1,97 mm), comprimento das raízes (28,2 cm), massa seca da parte aérea (0,342 g), massa seca das raízes (0,607 g) e, massa seca total (0,913 g), seguida de *Azospirillum brasilense*, tornando evidente a ação dessas duas bactérias na melhoria do crescimento de suas mudas (Figura 1.1).

O uso de rizobactérias também foi relatado para algumas espécies florestais. A inoculação de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* e *B. megaterium* aumentaram o crescimento da raiz primária e os níveis de fósforo e nitrogênio em mudas de *Araucaria angustifolia* (Kondo et al., 2024). Campos et al. (2023) identificaram que a inoculação de *Bacillus subtilis* levou a um crescimento mais significativo e melhoria na qualidade de mudas de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). Luciano et al. (2023) mostraram que a inoculação de *B. subtilis* no substrato resultou em desenvolvimentos significativos na altura e biomassa de *Eucalyptus urograndis*. Na qualidade das mudas de *Corymbia citriodora*, a aplicação de *Trichoderma* e *B. subtilis* mostrou resultados positivos em comparação com o controle para o Índice de Qualidade de Dickson e crescimento inicial (Ribeiro et al., 2023).

A baixa interação entre *B. subtilis* e *B. megaterium* com o ipê-amarelo pode estar relacionada à própria planta. Pesquisas mostraram que espécies vegetais podem responder de maneira diferente à associação com microrganismos promotores de crescimento, uma vez que a quantidade e a composição de substâncias liberadas nos exsudatos de espécies vegetais podem variar, afetando diretamente as respostas do inóculo (Zamioudis e Pieterse, 2012; Venturi e Keel, 2016; Velloso et al., 2019; Santos et al., 2020). Outra razão para a resposta divergente observada pode estar relacionada ao método de cultivo, como mostrado por Rios et al. (2018) e Santos et al. (2021), que conduziram plantios em solo rico em microrganismos. No entanto, são

necessárias mais informações sobre a associação desses microrganismos em plantas cultivadas em recipientes contendo substratos.

O parâmetro área foliar corroborou o comportamento de crescimento das mudas de ipê-amarelo (Figura 1.2B). Maior área foliar (60,2 cm²) foi observada com a inoculação de *B. amyloliquefaciens*. Por outro lado, as menores médias de área foliar, observadas para o controle, *B. subtilis* (23,1 cm²) e *B. megaterium* (25,6 cm²), contribuíram para o menor crescimento e desenvolvimento das mudas devido à baixa acumulação de energia luminosa. A área foliar também aumentou em 80% em plantas de *Musa acuminata* Colla quando inoculadas com *B. amyloliquefaciens* (105,96 cm²) em comparação com plantas de controle não inoculadas (58,86 cm²) (Gamez et al., 2019). Na espécie *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf., a área foliar de plantas inoculadas com *B. amyloliquefaciens* aumentou em 43%, em comparação com o controle (Zhao et al., 2016). Isso indica aumento no potencial fotossintético das mudas, com maior área de superfície para absorção de luz e, conseqüentemente, maior assimilação de carbono (Tang et al., 2015).

Para as análises de fluorescência, o mínimo (F₀) representa a fluorescência com todos os centros de reação abertos, indicando a fluorescência emitida pela clorofila, uma molécula do complexo de captação de luz do Fotossistema II. Por outro lado, a fluorescência máxima (F_M) representa a redução completa da quinona primária pela incidência de um pulso de luz em seu centro de reação, o que resulta em fluorescência máxima (Taiz et al., 2017). Para F_M, foram obtidos ganhos de 23,5% com rizobacterização de *B. amyloliquefaciens* e 13,9% com *A. brasilense*, em comparação com o controle (Figura 1.2E). Esse parâmetro pode ser atribuído à capacidade dessas bactérias de estabelecer uma atividade fotossintética maior e melhor sob condições climáticas semelhantes, o que reduz os riscos de danos por fotoinibição, mesmo que não haja diferença entre os tratamentos quanto ao conteúdo de clorofila (Stirbet et al., 2018).

No entanto, não houve diferença entre os tratamentos para a relação entre altura da parte aérea e diâmetro do caule na produção de mudas de ipê-amarelo. Essa relação expressa a robustez da planta, onde um valor mais baixo indica uma maior capacidade da planta de sobreviver e se estabelecer no campo (Cargnelutti et al., 2017). Assim, ao analisar essa característica, não se observa superioridade para

nenhuma bactéria; no entanto, quando apenas o diâmetro do caule é avaliado, observa-se a superioridade de *B. amyloliquefaciens* e *A. brasilense*, o que também pode explicar o melhor desempenho das mudas inoculadas com ambas as espécies, uma vez que o diâmetro do caule é o preditor de desempenho pós-plantio mais confiável, indicando a qualidade da planta (Ritchie et al., 2010).

Os resultados obtidos para o Índice de Qualidade de Dickson (IQD) reforçam a qualidade superior das mudas inoculadas com *B. amyloliquefaciens* seguidas por *A. brasilense*. O índice é um parâmetro completo para indicar o desempenho da muda, portanto, quanto maior o IQD, maior a qualidade da muda dentro desse lote (Lisboa et al., 2018). A fórmula do IQD usa a matéria seca das raízes, reconhecida como um dos indicadores mais simples que melhor determina o estabelecimento das mudas no campo, pois impacta diretamente a absorção de água e nutrientes (Shen et al., 2019; Avelino et al., 2021). Dessa forma, mudas com massa seca das raízes mais destacada terão mais sucesso no campo devido à sua melhor capacidade de aclimação após o transplante (Avelino et al., 2021). Essa característica mostrou resultados semelhantes ao IQD no presente estudo, fortalecendo ainda mais a superioridade da qualidade das mudas de ipê amarelo inoculadas com *B. amyloliquefaciens* seguidas por *A. brasilense*.

A maior média de massa seca das raízes das mudas inoculadas com *B. amyloliquefaciens* e *A. brasilense* pode ser devido ao maior comprimento, pois esse traço mostrou resultados semelhantes para ambas as bactérias e também um aumento nos pelos radiculares, como pode ser visto na Figura 1.5D. Quando as bactérias estão presentes nas raízes, elas causam mudanças na densidade e no comprimento dos pelos radiculares, aumentando a área de superfície das raízes, permitindo melhor uso de nutrientes e água (Hakim et al., 2021). Tais efeitos estão associados à capacidade das rizobactérias de liberar substâncias promotoras do crescimento, como ácido indolacético, giberelinas e citocininas (Ahemad e Kibret, 2014).

Logo, o maior número de unidades de colônia no substrato (Figura 1.4A) foi observado quando *B. amyloliquefaciens* e *A. brasilense* foram inoculados, confirmando que essas rizobactérias tiveram uma proliferação mais significativa neste substrato em associação com a espécie, além de mostrar os melhores resultados de

crescimento e qualidade para as mudas de ipê-amarelo. James Junior et al. (1985) observaram que esse aumento na colonização de plantas por certas bactérias é característico apenas à algumas cepas bacterianas que conseguem estabelecer laços irreversíveis nas raízes em comparação com bactérias que não colonizam as raízes. Essa característica foi também observada com a inoculação de *Azospirillum* em milho, onde os autores observaram que, o aumento da colonização de plantas promoveu o crescimento das raízes (Fallik et al., 1988).

Sendo assim, o ponto de partida na promoção do crescimento das plantas é a colonização da rizosfera e dos tecidos vegetais, como raízes e folhas (Bulgarelli et al., 2013). Neste estudo, o tratamento com *B. amyloliquefaciens* mostrou o maior número de unidades de colônia nas raízes ($4,7 \times 10^4$), seguido por *A. brasilense* ($3,6 \times 10^4$) (Figura 1.4B), indicando uma preferência do local para colonização dessas bactérias em ipê-amarelo. A inoculação de *B. amyloliquefaciens* também apresentou maior número de colônias nas partes aéreas, com $8,61 \times 10^3$ UFC g⁻¹ (Figura 1.4C), tornando a interação positiva dessa rizobactéria com a espécie estudada ainda mais evidente.

Diante dos resultados obtidos, foi possível observar que as rizobactérias testadas interferiram no crescimento, na qualidade e na capacidade fotossintética da espécie estudada e que, portanto, o uso destes microrganismos benéficos na produção de mudas de ipê-amarelo é promissor, concordando com Yarte et al. (2022) que também afirmaram que há potencial na aplicação de rizobactérias para melhorar a produção de mudas de ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos).

2.6 CONCLUSÕES

O uso de rizobactérias para cultivar mudas de ipê-amarelo melhorou os parâmetros de crescimento como altura da planta, diâmetro do caule, comprimento das raízes, biomassa da planta e área foliar. A espécie *Bacillus amyloliquefaciens* mostrou-se o inoculante mais eficiente. Além disso, a bactéria *Azospirillum brasilense* também pode ser uma alternativa na produção de mudas dessa espécie.

Com base na pesquisa, recomenda-se a aplicação das rizobactérias isoladas para otimizar a produção de mudas, com a redução no tempo de viveiro e na formação de mudas mais robustas e saudáveis.

2.7 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

2.8 REFERÊNCIAS

- Ahemad M, Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University-science** 26(1):1-20.
- Andre RGB, Garcia A (2015) Alguns aspectos climáticos do município de Jaboticabal, SP. **Nucleus**, 12(2): 263-270.
- Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, Elsas JDV, Vuurde JWV, Azevedo JL (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(10):4906-4914.
- Avelino NR, Schilling AC, Dalmolin ÂC, Santos MS, Mielke MS (2021) Alocação de biomassa e indicadores de crescimento para a avaliação da qualidade de mudas de espécies florestais nativas. **Ciência Florestal**, 31(4):1733-1750.
- Barbosa JC, Maldonado Júnior W (2015) **AgroEstat** - sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos - versão 1.1.0.711. Jaboticabal: UNESP, p. 396.
- Barry AL, Thornsberry C (1991) Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hausser WJ, Hermann KL et al. **Manual of clinical microbiology**, 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Van Themaat EVL, Schulze-Lefert P (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, 64:807–838.
- Campos TS, Patrício MP, Vieira GR, Souza AMBD, Santos CHB, Rigobelo EC, Pivetta KFL (2023) Rhizobacteria in growth and quality of açai seedlings. **Ornamental Horticulture**, 29:208-215.
- Cargnelutti A, Araujo MM, Gasparin E, Foltz, DRB (2017) Dimensionamento amostral para avaliação de altura e diâmetro de plantas de timbaúva. **Floresta e Ambiente**, 25(1):e00121314.
- Chandran H, Meena M, Swapnil P (2021) Plant growth-promoting rhizobacteria as a green alternative for sustainable agriculture. **Sustainability**, 13(19):10986.

Fallik E, Okon Y, Fischer M (1988) Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, 20(1):45-49.

Flora e Funga do Brasil (2024) Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 04 abr. 2024

Gamez R, Cardinale M, Montes M, Ramirez S, Schnell S, Rodriguez F (2019) Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). **Microbiological research**, 220:12-20.

Gonzalez EJ, Hernandez JP, De-Bashan LE, Bashan Y (2018) Dry micro-polymeric inoculant of *Azospirillum brasilense* is useful for producing mesquite transplants for reforestation of degraded arid zones. **Applied Soil Ecology**, 29:84-93.

Gupta G, Parihar SS, Ahirwar NK, Snehi SK, Singh V (2015) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and prospects for development of sustainable agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, 7(2):096-102.

Hakim S, Naqqash T, Nawaz MS, Laraib I, Siddique MJ, Zia R, et al. (2021) Rhizosphere engineering with plant growth-promoting microorganisms for agriculture and ecological sustainability. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 5:617157.

James Junior DW, Suslow TV, Steinback KE (1985) Relationship between rapid, firm adhesion and long-term colonization of roots by bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 50(2):392-397.

Kondo YR, Cruz SP, Chanway C, Kaschuk G. (2024) **Inoculation of *Azospirillum Brasilense* or *Bacillus* Spp. improves root growth and nutritional quality of araucaria (*Araucaria angustifolia*) seedlings**. 35. Disponível em SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4693232>

Kondo YR, Primon AP, Fioreze ACDCL, Cruz SPD (2020) Growth promotion of genetically improved *Pinus taeda* seedlings by inoculation with species of *Bacillus*. **Cerne**, 26:456-462.

Kumari B, Mallick MA, Solanki MK, Solanki AC, Hora A, Guo W (2019) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): modern prospects for sustainable agriculture. In: Ansari R, Mahmood I. **Plant health under biotic stress**. Singapore: Springer.

Lisboa AC, Melo CJA, Tavares FPA, Almeida RB, Melo LA, Magistrali IC (2018) Crescimento e qualidade de mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em substrato com esterco bovino. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 38:e201701485.

Lorenzi H (2020) **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 8 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Luciano DO, Lima CA, Lopes MB, Moura DMO, Ferreira ALL, Martins ALL, Junior AFC (2023) *Bacillus* e *Trichoderma* como promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Research, Society and Development**, 12(2):e11012239509.

Monteiro P, Winagraski E, Auer C (2014) **Importância do uso de rizobactérias na produção de mudas florestais**. Comunicado técnico, 338, Colombo: Embrapa Florestas. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1010557>.>Acesso em: 10 jan. 2024.

Oliveira Junior JC, Rodrigues MCS, Oliveira E, Souza FML, Dal Bem EA (2020) Enraizamento de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) via miniestaquia sob diferentes dosagens do extrato de *Cyperus rotundus*. **Brazilian Journal of Development**, 6(12):102703-102713.

Riaz U, Murtaza G, Anum W, Samreen T, Sarfraz M, Nazir MZ (2021) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers and biopesticides. In: Hakeem KR, Dar GH, Mehmood MA, Bhat RA. (eds). **Microbiota and Biofertilizers: a sustainable continuum for plant and soil health**, 181-196.

Ribeiro ASN, Junior AFC, Chagas LFB, Martins ALL, De Almeida LB, Nobrega GS, Alves MVG (2023) Efficiency of Trichoderma and *Bacillus subtilis* as growth promoters in eucalyptus *Corymbia citriodora*. **Observatório de la Economía Latinoamericana**, 21(11):20380-20397.

Rios FA, Freitas SKR, Contiero RL, Braz GBP, Roman R, Belani RB, Catapan V (2018) Agronomic performance of soybean treated with *Bacillus amyloliquefaciens*. **African Journal of Microbiology Research**, 12(45):1020-1027.

Ritchie GA, Landis TD, Dumroese RK, Haase DL (2010) Assessing plant quality. In: Landis TD, Dumroese RK, Haase DL. **Seedling processing, storage and outplanting**. Vol .7. Washington: U.S. Department of Agriculture, Agriculture. Handbook, 674: Forest Service; p. 17-81.

Sahm DF, Washington JA (1991) Antibacterial susceptibility tests: dilution methods. In: Balows , Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. **Manual of clinical microbiology**. 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Santos AF, Corrêa BO, Klein J, Bono JAM, Pereira LC, Guimarães VF, Ferreira MB (2021) Biometria e estado nutricional da cultura da aveia branca (*Avena sativa* L.) sob inoculação com *Bacillus subtilis* e *B. megaterium*. **Research, Society and Development**, 10(5):e53410515270.

Santos RM, Diaz PAE, Lobo LLB, Rigobelo EC (2020) Use of plant growth-promoting rhizobacteria in maize and sugarcane: Characteristics and applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 4:136.

Santoyo G, Urtis-Flores CA, Loeza-Lara PD, Orozco-Mosqueda MDC, Glick BR (2021) Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Biology**, 10(6):475.

Souza AMB, Chioda LB, Ferreira KB, Vieira GR, Campos TS, Pivetta KFL (2022) Initial growth of *Syagrus romanzoffiana* seedlings in biosolid-based substrate. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 52:70577.

Stirbet A, Lazar D, Kromdijk J, Govindjee (2018) Chlorophyll a fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? **Photosynthetica**, 56(1):86-104.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2017) **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, p. 858.

Tang H, Hu YY, Yu WW, Song LL, Wu JS (2015) Growth, photosynthetic and physiological responses of *Torreya grandis* seedlings to varied light environments. **Trees**, 29:1011-1022.

Velloso CCV, Carvalho C, Paiva C, Lana UDP, Gomes EA, Pastina MM, et al. (2019) **Resposta diferencial de genótipos de milho à inoculação com bactérias promotoras do crescimento em plantas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 27 p. il. ISSN 1679-0154. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/211167/1/bol-203.pdf>> Acesso em: 10 jan. 2024.

Venturi V, Keel C (2016) Signaling in the rhizosphere. **Trends in Plant Science**, 21(3):187-198.

Vieira FCS, Nahas E (2005) Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. **Microbiological Research**, 160(2):197-202.

Wollum AG (1983) **Cultural methods for soil microorganisms**. Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties, 9:781-802.

Yarte ME, Santos MP, Gismondi MI, Llorente BE, Larraburu EE (2022) Evaluation of native plant growth-promoting rhizobacteria in *Handroanthus impetiginosus* micropropagation. **Trees**, 37(3):641-652.

Zamioudis C, Pieterse CM (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 25(2):139-150.

Zhao Q, Wu YN, Fan Q, Han QQ, Paré PW, Xu R, Zhang, JL (2016) Improved growth and metabolite accumulation in *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. by inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* GB03. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64(43):8103-8108.

Zhu Y, Wang Y, He X, Li B, Du S (2023) Plant growth-promoting rhizobacteria: A good companion for heavy metal phytoremediation. **Chemosphere**, 338:139475.

CAPÍTULO 3 – Promoção de crescimento de mudas de Ipê-roxo (Bignoniaceae) por inoculação de rizobactérias

3.1 RESUMO

A utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal tem se destacado na busca por tecnologias sustentáveis que impulsionem a produção agrícola global. As bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Azospirillum* que habitam principalmente a rizosfera, demonstram a capacidade adicional de colonizar os tecidos da parte aérea das plantas, contribuindo para resistência das mesmas à estresses abióticos e para melhorar a disponibilização e absorção de nutrientes. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal na produção de mudas de ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*), importante espécie arbórea nativa usada no paisagismo e ameaçada de extinção. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os tratamentos consistiram nas rizobactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Azospirillum brasilense* mais a ausência de bactérias – controle; foram quatro repetições e dez plantas por parcela. Avaliou-se a altura da parte aérea; diâmetro do coleto; comprimento do sistema radicular; massa seca da parte aérea, das raízes e total; a razão altura da parte aérea/diâmetro do coleto e o Índice de Qualidade de Dickson. Foi determinado também o número de folhas, área foliar, índice SPAD, fluorescência mínima, fluorescência máxima e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II. Os inóculos *B. subtilis* e *A. brasilense* promoveram aumento no crescimento, acúmulo de biomassa, maiores níveis de qualidade e melhorias na fluorescência da clorofila em comparação com o tratamento controle. Os resultados evidenciaram que as rizobactérias utilizadas no presente estudo têm capacidade de colonizar as mudas de ipê-roxo, promovendo o desenvolvimento e aumentando a eficiência fotossintética das mesmas. Assim, conclui-se que, a aplicação das rizobactérias *B. subtilis* e *A. brasilense* demonstrou ser eficaz para promover o crescimento sustentável de mudas de ipê-roxo, contribuindo significativamente para melhorias na qualidade e no manejo do cultivo em viveiros.

Palavras-chave: *Handroanthus impetiginosus*; Microrganismos promotores de crescimento de plantas; Mudas Florestais, Viveiro, Fotossíntese.

3.2 INTRODUÇÃO

Ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus* Mart. ex DC. Mattos), pertencente à Bignoniaceae é uma árvore perene e de grande porte, cuja altura pode chegar a 30 m; sua principal característica é a floração vistosa, de coloração magenta, sendo amplamente distribuída em florestas tropicais sazonais secas da América Central e do Sul (Lorenzi, 2020).

O ipê-roxo é utilizado de diferentes formas; sua madeira é destinada à fabricação de móveis e na construção civil e naval em decorrência da qualidade tecnológica da mesma, a qual possui como características a alta resistência mecânica e a longa durabilidade natural (Silva-Junior et al., 2018). Sua casca, flor e folha são bastante utilizadas como fitofármacos em virtude da presença isolada de substâncias com ação em atividades biológicas anticancerígenas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas e anti-leishmaníaca (Valle et al., 2023; Ahmad et al., 2020; Mariano et al., 2022; Santos et al., 2023). Além dessas utilizações, essa espécie é recomendada na recuperação de áreas degradadas (Viana et al., 2019) ou para fins ornamentais, devido à sua beleza cênica durante o período de floração, ideal à projetos de paisagismo ou na arborização urbana (Lorenzi, 2020).

No estágio inicial do crescimento das espécies de ipê-roxo, é comum observar um desenvolvimento lento e um sistema radicular fraco, o que impacta negativamente o crescimento em altura e a qualidade geral das plantas. Essas condições comprometem significativamente a sobrevivência das plantas durante os estágios posteriores (Lima et al., 2014; Viana et al., 2019). Nesse aspecto, para a utilização da espécie, a produção e disponibilidade de mudas vigorosas e de qualidade são indispensáveis.

Um dos recursos que contribuem para a produção de plantas mais resistentes, saudáveis e em menor tempo é o uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas. Diversos estudos verificaram que algumas espécies de bactérias, denominadas rizobactérias, tem a capacidade de colonizar as raízes, que proporcionam estímulos diretos ou conferem benefícios ao crescimento, desenvolvimento e resistência à fatores bióticos e abióticos em várias espécies de plantas (Castro et al., 2020; Kondo et al., 2020; Alexandre et al., 2021; Campos et al., 2023; Rodrigues et al., 2023; Tarh et al., 2023). Na rizosfera, uma porção significativa da superfície radicular, aproximadamente entre 7% e 15%, é ocupada por uma diversidade de bactérias, e a atividade microbiológica nessa região, que se estende desde a superfície da raiz até uma distância de 1 a 3 mm, engloba diversas espécies com importância para o desenvolvimento vegetal (Santoyo et al., 2016). As rizobactérias têm habilidade de desenvolvimento extracelular nos tecidos radiculares de diversas plantas, por demonstrar a capacidade de promover o crescimento vegetativo mediante a produção

de sinais ou substâncias específicas promotoras do crescimento vegetal (Olanrewaju et al., 2017).

Estudos apontam que as rizobactérias pertencentes ao gênero *acillus* têm a capacidade de influenciar o crescimento e o desenvolvimento das plantas através da síntese e liberação de fitohormônios, como citocinina, ácido abscísico e regulação hormonal das giberelinas (Miljaković et al., 2020). Estas podem atuar na solubilização do fosfato, estimulando o crescimento da planta por meio de uma nutrição apropriada de fósforo, além de aumentar a absorção de nitrogênio, fósforo, potássio e ferro e, ainda, algumas espécies demonstram a capacidade de reduzir o Fe III que é tóxico as plantas, para Fe II que não é tóxico (Meena et al., 2016). Adicionalmente, essas rizobactérias apresentam potencial como agentes biológicos contra doenças de plantas e resistência aos estresses hídrico, salino e térmico (Hashem et al., 2019).

Já as bactérias do gênero *Azospirillum* são vantajosas para as plantas devido à sua habilidade de fixar o nitrogênio molecular (N₂), tornando-o mais disponível para as plantas (Fukami et al., 2018). Também induzem a produção e liberação de fitormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas (Cassán et al., 2020).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal na produção de mudas de ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O Experimento foi conduzido durante os meses de setembro 2021 a janeiro de 2022, em casa de vegetação, pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), Câmpus de Jaboticabal, SP (21°14'45" S, 48°18'58" O e altitude 595 m). O clima da microrregião, pelo sistema de Köppen-Geiger, é classificado como do tipo Aw - tropical de savana, com inverno seco e, pelo sistema de Thornthwaite, mostra a região com clima úmido e pequena deficiência hídrica no inverno (Andre e Garcia, 2015).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Foram quatro tratamentos, sendo: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Azospirillum brasilense*, mais o controle (a ausência de rizobactéria), com quatro repetições e dez plantas por parcela.

Foram utilizadas sementes de *H. impetiginosus* colhidas de matrizes existentes no Viveiro Experimental de Plantas Ornamentais e Florestais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV) durante o mês de setembro de 2021. A semeadura foi realizada em tubetes com capacidade volumétrica de 280 cm³, e os mesmos foram acondicionados em bandejas de polipropileno com capacidade para 54 recipientes, contendo como substrato comercial Carolina Soil®, o qual possui em sua composição turfa, vermiculita, casca de arroz torrefada, calcário dolomítico calcinado, fertilizante NPK 14-16-18 e micronutrientes (informações obtidas a partir de dados existentes na embalagem). As bandejas com os tubetes foram suspensas em bancadas de malhas metálicas a 70 cm do solo, em casa de vegetação coberta e com as laterais protegidas com tela preta que permite a passagem de 50% da luz e, ainda, com cobertura de plástico transparente acima da cobertura de tela.

Foram distribuídas três sementes por tubete e, cinco dias após a emergência, foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma plântula por recipiente, utilizando-se como critério a plântula de maior vigor e mais centralizada. A irrigação das mudas foi realizada por meio de microaspersores acionados automaticamente, três vezes ao dia com duração de 15 minutos cada com vazão de 30 L h⁻¹.

3.3.1 Produção e preparo do inóculo

Os microrganismos fazem parte da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Produção Vegetal da UNESP-FCAV, Câmpus de Jaboticabal, onde foram produzidos separadamente, em meio de caldo nutritivo por sete dias em frascos mantidos em B.O.D. (Eletrolab, modelo 347 F, Brasil), à temperatura de 25 °C. Após o período de incubação, os microrganismos foram centrifugados separadamente a 10.000 rpm durante 10 minutos à 28 °C (Novatecnica, modelo MLW K24, Brasil). A concentração do inóculo foi padronizada conforme recomendação de Barry e Thornsberry (1991) e Sahm e Washington (1991) em 1×10^7 UFC mL⁻¹ com auxílio de espectrofotômetro (Micronal, modelo B382, Brasil) na absorbância de 695 nm.

3.3.2 Rizobacterização do substrato

A inoculação dos microrganismos foi realizada duas vezes, sendo a primeira aos 30 dias após a semeadura e a segunda aos 60 dias, por meio da aplicação de 1,0 mL da solução no substrato próximo ao caule, com o auxílio de micropipeta mecânica (VF-1000, Digipet®). As mudas destinadas ao tratamento controle não foram inoculadas.

3.3.3 Variáveis de crescimento e qualidade

Quando as raízes começaram a aparecer na base inferior dos tubetes, após 107 da semeadura, foram avaliadas as características: altura da parte aérea (cm), medida a partir do nível do substrato até o ápice da última folha com o auxílio de régua milimetrada; diâmetro do coleto (mm), determinado ao nível do substrato, com uso de paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Western® PRO DC-6); contagem do número de folhas totalmente expandidas; comprimento do sistema radicular (cm), levando em consideração o comprimento da maior raiz, obtido com o auxílio de régua milimetrada; massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR), obtidas após a secagem em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C até atingir peso constante, sendo posteriormente pesadas em balança de precisão de 0,001g (SHIMADZU®, modelo AY220) e os resultados expressos em gramas; massa seca total (MST), obtida somando-se as massas secas da parte aérea e das raízes, resultados expressos em g planta⁻¹.

Determinou-se também, a razão entre a altura da parte aérea e o diâmetro do coleto (H/DC) e o Índice de Qualidade de Dickson (IQD), obtido pela fórmula proposta por Dickson em 1960, aplicada em várias pesquisas, como descrita em Souza et al. (2022), onde:
$$IQD = \frac{MST \text{ (g)}}{[H \text{ (cm)}/DC \text{ (mm)} + MSPA \text{ (g)}/MSR \text{ (g)}]}$$

3.3.4 Variáveis do comportamento fotossintético

Foi mensurada a área foliar (AF cm²) utilizando medidor eletrônico de área foliar (Li-3100C, LI-COR®, Lincoln, Nebraska, USA) e determinado o teor de clorofila, com o aparelho ClorofiLOG, modelo CFL1030, marca FALKER®; a fluorescência mínima (Fo), fluorescência máxima (Fm) e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm), foram obtidas pelo fluorômetro portátil (OS30p, Opti Science).

3.3.5 Variáveis microbiológicas

Foi realizada, ainda, a contagem de bactérias no substrato, raízes e parte aérea, nos tratamentos onde se realizou a aplicação das rizobactérias, a fim de observar a mobilização das mesmas após a inoculação.

A contagem de bactérias presentes no substrato foi realizada em dez gramas de material fresco, que foram adicionados a um frasco Erlenmeyer contendo 95 mL de solução salina de pirofosfato de sódio 0,1%. Todos os frascos Erlenmeyer foram agitados por 1 hora e, do conteúdo dos frascos foram preparadas diluições em série seguindo a metodologia proposta por Wollum (1983). Cem microlitros (100 µL) das soluções obtidas por diluição foram inoculados em placas de Petri contendo meio ágar nutriente em triplicata. Em seguida, as placas foram mantidas em câmara tipo B.O.D. a 30 °C, e o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi contado após 24, 48 e 72 horas (Vieira e Nahas, 2005).

Para a contagem de bactérias nas plantas, estas foram separadas em parte aérea e raízes e lavadas com água corrente. Para eliminação de microrganismos epifíticos, um grama (1 g) de cada tecido vegetativo (folhas e raízes) foi submetido à desinfecção superficial. Ambos os tecidos foram imersos sequencialmente em etanol 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio (2,0-2,5% Cl ativo) por 3 minutos e etanol 70% por 30 segundos. Posteriormente, os tecidos foram lavados três vezes com água destilada (Araújo et al., 2002). Uma vez lavados e esterilizados, os tecidos foram macerados assepticamente com o auxílio de um matraz e pilão e, em seguida, foram realizadas diluições e, alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar triptona soja para isolamento de bactérias. Essas placas foram cultivadas em estufas microbiológicas à temperatura constante de 30 °C durante 24 horas para crescimento de bactérias e a contagem do número de UFC foi realizado após 24, 48 e 72 horas.

3.3.6 Procedimentos estatísticos

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o Software AgroEstat (Barbosa e Maldonado Junior, 2015). Os dados foram apresentados em gráficos Boxplot elaborados em R Core Team (2013).

3.4 RESULTADOS

Os resultados obtidos no experimento de produção de mudas de ipê-roxo, via inoculação de rizobactérias em substrato, mostraram efeito significativo ($P < 0,05$) para todos os parâmetros avaliados.

A rizobactéria *Azospirillum brasilense* se destacou, apresentando maiores médias para altura da parte aérea (13,9 cm), diâmetro do coleto (1,72 mm), massa seca da parte aérea (0,172 g) e massa seca total (0,686 g) (Figura 2.1). Para massa seca de raiz, *A. brasilense* não apresentou diferença para *Bacillus subtilis* com médias de 0,503 g e 0,443 g, respectivamente (Figura 2.1E). Já com relação ao comprimento de raiz, as rizobactérias não diferiram entre si, com média de 19,98 cm, sendo todas, exceto a *B. amyloliquefacens*, superiores ao controle (Figura 2.1C).

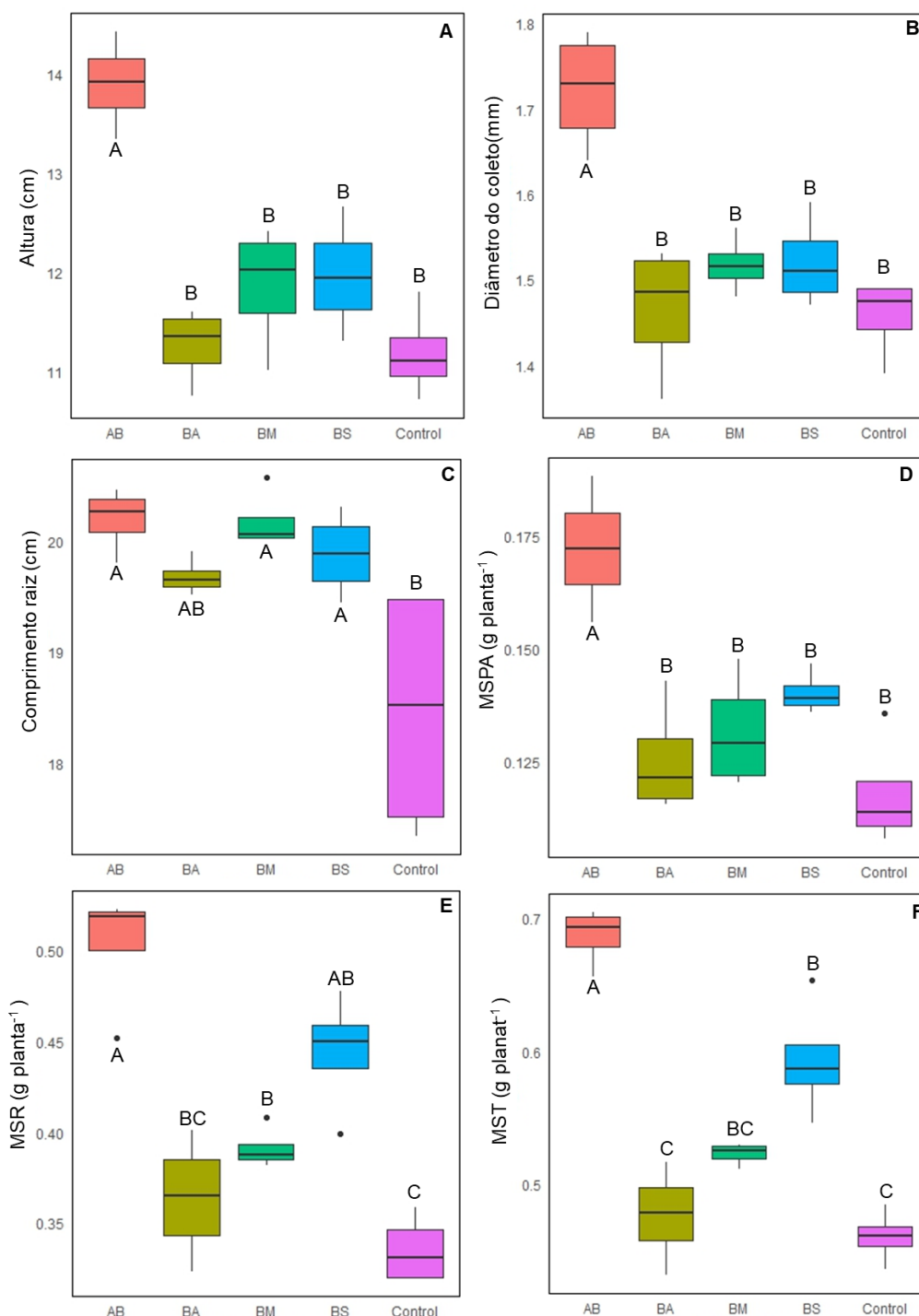


Figura 2.1: Boxplots para avaliação do crescimento de mudas de *Handroanthus impetiginosus* inoculadas com rizobactérias para **A** - altura da parte aérea (cm), **B** - diâmetro do coleto (mm), **C** - comprimento da raiz (cm), **D** - MSPA - massa seca da parte aérea (g planta⁻¹), **E** - MSR - massa seca de raízes (g planta⁻¹), **F** - MST - massa seca total (g planta⁻¹). Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus amyloliquefaciens* (BA), *Bacillus megaterium* (BM), *Bacillus subtilis* (BS) e sem inoculação (Controle). Jaboticabal, SP, 2022.

Em relação à qualidade das mudas, *A. brasilense* apresentou a maior média para a relação H/DC (8,82) e IQD (0,089), sendo superior às demais rizobactérias e ao controle, com o incremento de 18,8% para H/DC e 60,36% para o H/DC quando comparada com o controle (Figura 2.2).

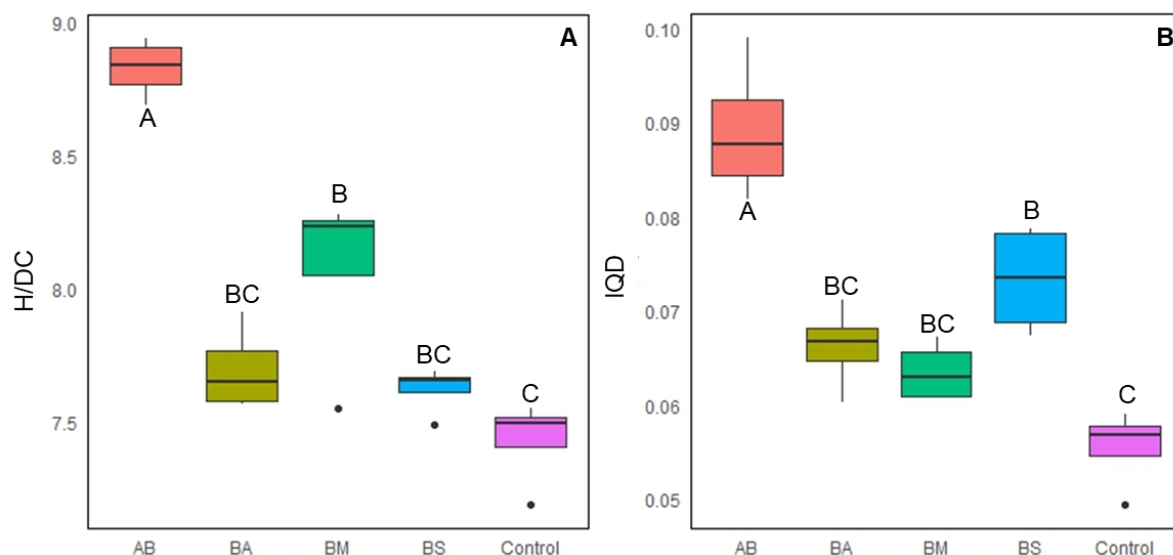


Figura 2.2: Boxplots para avaliação da qualidade de mudas de *Handroanthus impetiginosus* inoculadas com rizobactérias, **A** - razão altura da parte área pelo diâmetro do coleto (H/DC), **B** - Índice de Qualidade de Dickson (IQD). Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus amyloliquefaciens* (BA), *Bacillus megaterium* (BM), *Bacillus subtilis* (BS) e sem inoculação (Controle). Jaboticabal, SP, 2022.

Observando o crescimento radicular, este não apresentou expressivo aumento de comprimento (Figura 2.3C), no entanto, houve incremento significativo na massa seca promovido pelo aumento na formação de raízes secundárias (Figura 2.3E). É possível observar esse ganho pelo aspecto morfológico das mudas de ipê-roxo aos 107 dias após a semeadura (Figura 2.3). Esse ganho não se refletiu apenas no sistema radicular, como também em outras partes vegetativas das mudas e, a Figura 3 permite comparar os aspectos morfológicos dos ganhos obtidos apresentados entre os tratamentos.



Figura 2.3: Aspecto visual das mudas de *Handroanthus impetiginosus* aos 107 dias após a semeadura. Tratamentos: Controle (A), *Bacillus amyloliquefaciens* (B), *Bacillus megaterium* (C), *Bacillus subtilis* (D) e *Azospirillum brasilense* (E). Jaboticabal, SP, 2022.

Os parâmetros fotossintéticos das mudas de ipê-roxo como o número de folhas, área foliar, índice SPAD e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II, destacou as rizobactérias *A. brasilense* que apresentou valores médios de 4,4; 32,43 cm²; 18,86; 0,738, respectivamente, e *B. subtilis* com valores de 4,2; 28,22 cm², 18,14; 0,705, respectivamente (Figura 2.4). A rizobactéria *B. amyloliquefaciens* apresentou fluorescência máxima de 458 e mínima de 149, sendo indicativo de estresse fisiológico das mudas.

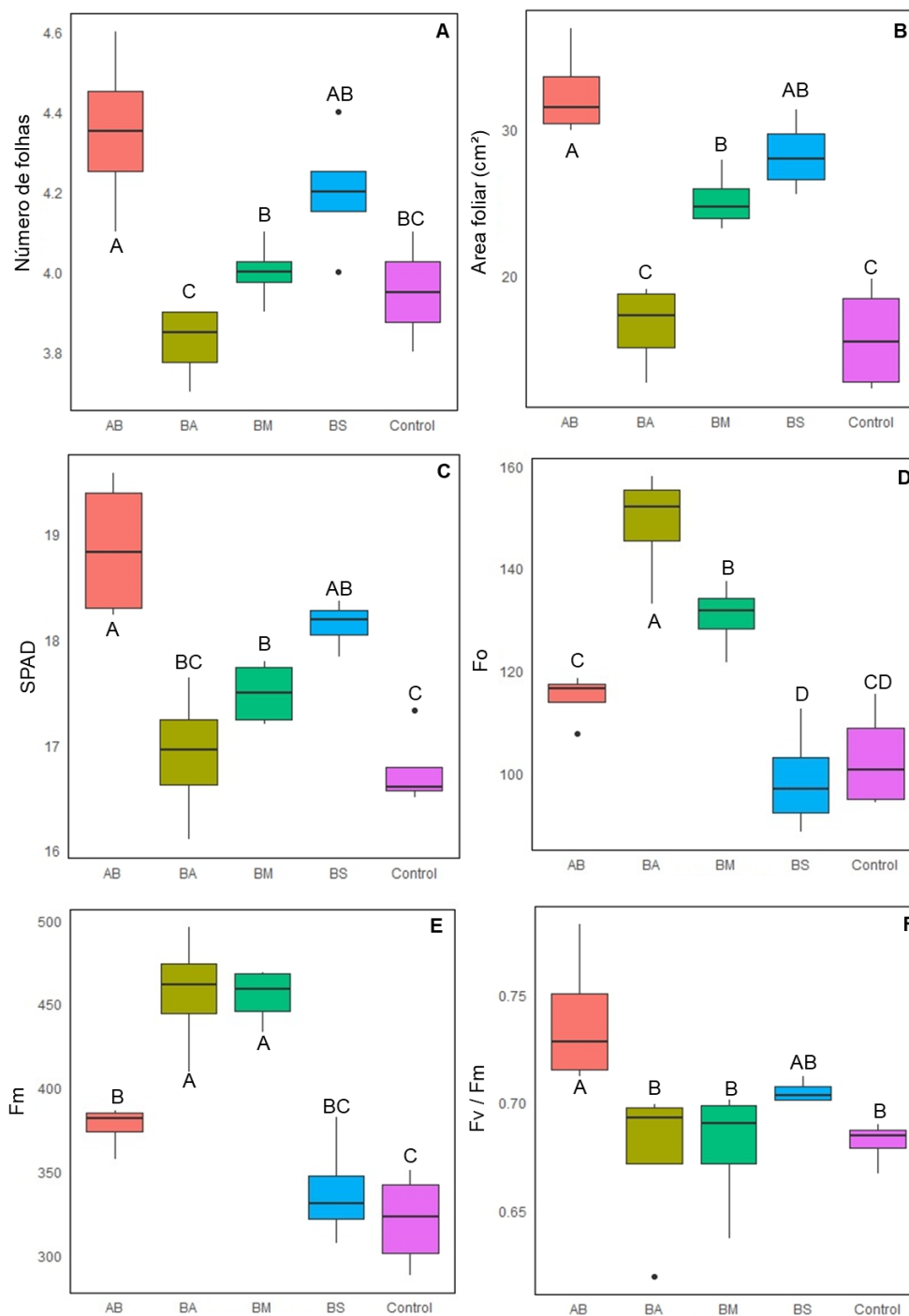


Figura 2.4: Boxplots para avaliação do desempenho fotossintético de mudas de *Handroanthus impetiginosus* inoculadas com rizobactérias, **A** – número de folhas, **B** – área foliar (cm²), **C** – SPAD, **D** - fluorescência mínima (Fo), **E** - fluorescência máxima (Fm), **F** - máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm). Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus amyloliquefaciens* (BA), *Bacillus megaterium* (BM), *Bacillus subtilis* (BS) e sem inoculação (Controle). Jaboticabal, SP, 2022.

Para os atributos microbiológicos (Figura 2.5), verificou-se que a inoculação da rizobactéria *Azospirillum brasilense* promoveu maior colonização de bactérias no substrato (6.071.262 UFC/mL), nas raízes (98.628 UFC/mL) e na parte aérea (6.636 UFC/mL), à qual diferiu estatisticamente dos demais tratamentos.

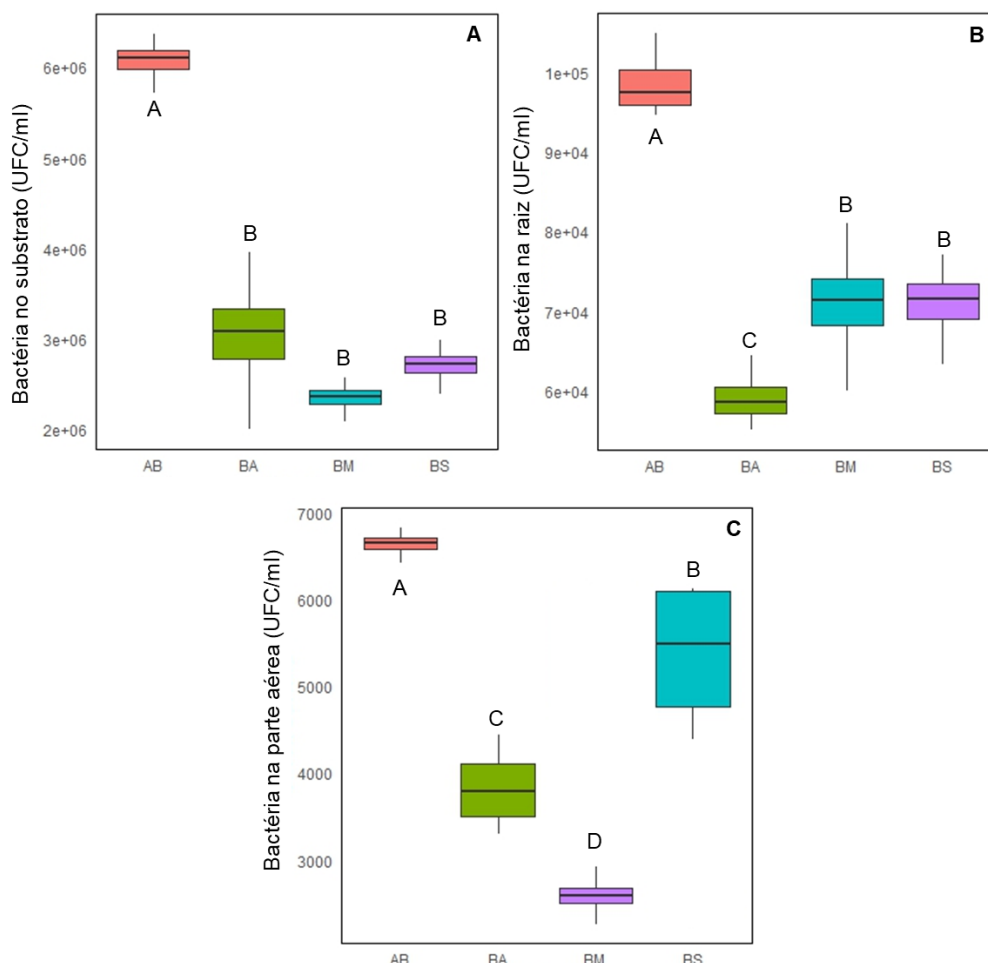


Figura 2.5: Boxplots para contagem de bactérias em mudas de *Handroanthus impetiginos* inoculadas com rizobactérias, **A** - UFC no substrato, **B** - UFC na raiz, **C** – UFC na parte aérea. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). *Azospirillum brasilense* (AB), *Bacillus amyloliquefaciens* (BA), *Bacillus megaterium* (BM), *Bacillus subtilis* (BS). Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/ml). Jaboticabal, SP, 2022.

3.5. DISCUSSÃO

A associação simbiótica entre plantas e bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Azospirillum* proporciona diversos benefícios para o desenvolvimento e sanidade vegetal. A capacidade de interação entre o ipê-roxo e as bactérias naturalmente endofíticas foi constada por Yarte et al. (2022), que coletaram folhas e raízes de

árvores adultas distribuídas naturalmente e identificaram bactérias endofíticas nativas dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rummeliibacillus* e *Methylobacterium*, apresentando, a maioria das cepas, potencial de promover o crescimento de plantas e resistência às condições salinas. Llacsá et al. (2019) também analisaram a diversidade de bactérias na rizosfera de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos e *Handroanthus billbergii* Bureau & K. Schum., e identificaram mais de 546 e 154 bactérias, respectivamente. Desse modo, o conhecimento desse tipo de associação contribui para a aplicação da tecnologia de rizobacterização para a Bignoniaceae.

Os efeitos benéficos da inoculação de rizobactérias na promoção do crescimento de mudas de espécies florestais é muito estudado, sendo relatados para diversas espécies como *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Cunha et al., 2013), *Corylus avellana* L. (Rostamikia et al., 2016), *Euterpe oleracea* Mart (Castro et al., 2020; Campos et al., 2023), *Handroanthus impetiginosus* (Rodrigues et al., 2023), *Jacaranda mimosifolia* D. Don (Missio, 2016), *Pinus taeda* L. (Kondo et al., 2020), *Soymida febrifuga* (Roxb.) Juss. (Tarh et al., 2023) e *Tectona grandis* L.f. (Alexandre et al., 2021). Os principais resultados destas pesquisas foram em relação ao aumento do crescimento da planta, proteção contra estresses abióticos e eficiência na absorção de água e nutriente.

Os resultados do presente estudo evidenciaram o efeito positivo de *A. brasilense* seguido por *B. subtilis* sobre o crescimento e qualidade das mudas de ipê-roxo, expresso pela altura, diâmetro do coleto, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, massa seca total, relação H/DC e IQD. Desse modo, *A. brasilense* mostrou-se eficaz no crescimento e qualidade das mudas quando comparado ao controle, promovendo ganhos de 24,2% para altura, 18,2% para o diâmetro do coleto, 9,39% para o comprimento de raiz, 45,9%, para massa seca de parte aérea, 50,2% na massa seca de raiz, 49,2% na massa seca total, 18,76% para H/DC e 60,36% para IQD.

Este resultado corrobora com o sucesso da propagação *in vitro* na interação entre o ipê-roxo e *Azospirillum brasilense* indicado por Larraburu e Llorente (2015 a,b), em que, a colonização bacteriana melhorou a divisão celular, o crescimento secundário do caule e a densidade dos pelos radiculares em comparação com as

plantas não inoculadas. Porém, para *Jacaranda mimosifolia*, também pertencente à Bignoniaceae, Salotti et al. (2023) observaram que não há interações positivas com inoculação de *A. brasilense* para o crescimento *in vitro*. No entanto, isso é um indicativo de que a espécie de bactéria possui influência sobre os aspectos estudados.

A inoculação de *Azospirillum* também melhorou o crescimento e a qualidade de mudas de *Soymida febrifuga* (Tarh et al., 2023), em que, houve incremento em altura, diâmetro do coleto, área foliar total, massa seca de mudas e IQD. No entanto, *A. brasilense*, não foi efetiva no crescimento e qualidade para as arbóreas *A. pavonina* L. (Almeida et al., 2021), *Cassia leptophylla* Vogel., *Lafoensia pacari* Saint-Hilaire., *Mimosa flocculosa* Burkart e *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Felix et al., 2021). O efeito da rizobacterização é, portanto, variável com a espécie vegetal, como ocorreu neste estudo e demais autores.

Para *B. subtilis*, os ganhos em crescimento e qualidade comparada ao tratamento controle, foram de 7,01% para altura, 4,29% para o diâmetro do coleto, 7,69% para o comprimento de raiz, 18,93% na massa seca de parte aérea, 32,52% na massa seca da raiz, 28,79% na massa seca total, 2,55% para H/DC e 31,94% para IQD.

O potencial da inoculação de microrganismos para ipê-roxo desenvolvido 60 dias em viveiro foi recentemente mostrado por Rodrigues et al. (2023). Estes autores verificaram que a inoculação de isolados de *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* aumentaram a altura de $10,80 \pm 0,76$ cm para $12,30 \pm 1,20$ cm, o diâmetro em $4,08 \pm 0,30$ mm e a massa seca total em $0,84 \pm 0,14$ g. Em mudas de *Euterpe oleracea* inoculadas com *B. subtilis* houve aumento do diâmetro do coleto, do comprimento de raiz e do IQD (Campos et al., 2023); para a mesma espécie, a inoculação de consórcio microbiano (*Bacillus subtilis* + *Burkholderia* sp. + *Bacillus safensis* + *Pseudomonas fluorescens*) melhorou o crescimento em altura, o comprimento e a massa seca de raiz e a relação H/DC (Rodrigues et al., 2023). Para a arbórea *Jacaranda mimosifolia* houve incremento de 14 % em altura, 7,4 % em diâmetro do coleto, 11,8% em massa seca da parte aérea, 19,52 % em massa seca da raiz quando mudas foram inoculadas com *B. subtilis* (Missio., 2016). *B. subtilis* e *B. megaterium* promoveram melhor IQD em mudas de *Pinus taeda* (Kondo et al., 2020). No entanto, o uso de *B. subtilis* na

produção de mudas de *Caesalpinia peltophoroides* não é recomendado (Cunha et al., 2013).

As variáveis número de folhas, área foliar e índice SPAD são indicativas do potencial fotossintético da planta, pois representam a superfície de captação de energia luminosa e, por conseguinte, a assimilação de carbono e a intensidade do verde da folha (Taiz et al., 2017). Os melhores resultados, neste estudo, foram com a inoculação de *A. brasilense* e *B. subtilis*.

No entanto, mudas de ipê-roxo inoculadas com *Bacillus subtilis* avaliadas aos 60 dias não apresentaram diferença para teor de clorofila (SPAD) entre os demais microrganismos e o controle (Rodrigues et al., 2023), provavelmente em decorrência do menor período de avaliação e das condições de experimentação em comparação com o presente estudo. Já mudas de *Corylus avellana* inoculadas com o consórcio bacteriano *Pseudomonas putida* + *Bacillus subtilis* + *Enterobacter cloacae*, avaliadas aos 240 dias após a semeadura, apresentaram aumento no índice SPAD e na área foliar (Rostamikia et al., 2016). Em estudos que envolvem a interação de plantas com microrganismos deve-se considerar a biologia e o ciclo de vida das rizobactérias específicas em questão (Santoyo et al., 2016). Logo, deve-se garantir que o tempo de condução do estudo seja adequado para observar as respostas desejadas, podendo experimentos mais longos oferecer uma compreensão mais abrangente das adaptações e respostas das rizobactérias.

Quando observada a fluorescência, as mudas que foram inoculadas com *B. amyloliquefaciens* e *B. megaterium* apresentaram altos valores (Figura 4D), os quais são indicativos da manutenção dos centros de reação do PSII (fotossistema II) abertos, que geram um alto gasto energético, buscando a adaptação às condições fotoinibitórias provenientes do ambiente (Kalaji et al., 2016). Em relação a eficiência fotossintética, que é a fração da luz solar absorvida pelo PSII que não pode ser usada fotoquimicamente e dissipada como calor (F_0/F_m), se destacaram *A. brasilense* e *B. subtilis*. Os valores de F_v/F_m foram de 0,738 e 0,705, respectivamente, e quando comparadas ao controle houve aumento médio de 8,25% (Figura 4F).

O rendimento quântico máximo do PSII, ou seja, o índice proporcional à taxa de fotossíntese (F_v/F_m) indicou que a eficiência de captura desta energia de excitação pelos centros de reação abertos do PSII foi baixa, pois acredita-se que o valor de

Fv/Fm deve estar próximo de 0,83–0,85 sob condições controladas (Stirbet et al., 2018). As alterações na relação Fv/Fm também podem ser desencadeadas por extinção não fotoquímica, degradação da proteína D1 e inativação de centros de reação do PSII, sendo parâmetros confiáveis na avaliação dos estresses oxidativos (Kalaji et al., 2016; Stirbet et al., 2018).

Sabe-se que à medida que as plantas se desenvolvem, a necessidade por recursos hídricos e nutricionais aumentam. Em situações de escassez desses recursos, as plantas recorrem às suas reservas energéticas, resultando em maiores gastos metabólicos para assegurar a sobrevivência (Taiz et al., 2017). No âmbito deste estudo, a irrigação foi realizada diariamente, sem a aplicação de fertilização suplementar, considerando apenas os nutrientes presentes no substrato ao longo dos meses de experimento, podendo ser a causa de todos os valores abaixo dos normais indicados. Logo, *A. brasilense* e *B. subtilis* proporcionaram fotoproteção às plantas, diferente de *B. amyloliquefaciens* e *B. megaterium* dentro das condições de cultivo.

O uso de rizobactérias também melhorou os efeitos da capacidade fotossintética em *Eutерpe oleracea* quando inoculada com consórcio das bactérias *Bacillus subtilis* + *Burkholderia* sp. + *Bacillus safensis* + *Pseudomonas fluorescens* (Castro et al., 2020). Os autores identificaram aumento de SPAD, média de 23, menor valor para fluorescência mínima, de 190 e melhor eficiência do PSII (0,8).

A colonização por *Azospirillum brasilense*, promoveu ganhos de 125% para UFC no substrato, 47% para UFC na raiz e 68,6% para UFC na parte aérea comparada as demais rizobactérias (Figura 5). Os benefícios associados às espécies *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* são a fixação biológica de nitrogênio, o estímulo ao crescimento radicular, a melhora na absorção de nutrientes e a eficiência no uso da água (Meena et al., 2016; Fukami et al., 2018). Sua presença na rizosfera fortalece a resistência das plantas aos estresses hídrico, salino e térmico, assim como a resistência aos patógenos do solo, atuando como agentes de controle biológico (Olanrewaju et al., 2017; Ferreira et al., 2019; Hashem et al., 2019). Além disso, essas bactérias também produzem compostos promotores de crescimento, como auxinas e citocininas, que impactam positivamente o desenvolvimento vegetal (Cassán et al., 2020; Miljaković et al., 2020).

As características das rizobactérias apoiam os resultados encontrados. A alta colonização de bactérias no substrato contribuiu para a melhor associação e mobilização das rizobactérias na planta. Pôde-se inferir então, que a inoculação de rizobactérias específicas, como *A. brasilense* e *B. subtilis*, promoveu o melhor uso dos recursos disponíveis no substrato para as mudas de ipê-roxo, como demonstrado no presente estudo, acarretando o incremento no número de folhas e área foliar, que exerceu influência significativa no crescimento e na qualidade das mudas avaliadas. Esse resultado, portanto, é atribuído à interação favorável entre o ipê-roxo e as rizobactérias.

3.6 CONCLUSÕES

A produção de mudas de ipê-roxo em substrato inoculado com rizobactérias pré-selecionadas, aumenta a produção de raízes e folhas, assim como todo o desenvolvimento vegetativo. Houve interação positiva entre as mudas de ipê-roxo e *Azospirillum brasilense*.

A utilização da rizobactéria *Azospirillum brasilense* pode ser empregada com o intuito de maximizar a produção de mudas de ipê-roxo, bem como otimizar a eficiência dos recursos fisiológicos.

3.7 AGRADECIMENTOS, APOIO FINANCEIRO E DIVULGAÇÃO COMPLETA

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores declaram ainda que não há conflito de interesses na pesquisa e publicação do manuscrito.

3.8 REFERÊNCIAS

- Ahmad F, Bibi S, Kang M, Anees M, Ansar M, Alam MR, Kim SY, Wahedi HM (2020) Naphthoquinones from *Handroanthus impetiginosus* promote skin wound healing through Sirt3 regulation. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 23(9):1139.
- Alexandre FS et al. (2021) Arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus clarus*) and rhizobacteria (*Bacillus subtilis*) can improve the clonal propagation and development of teak for commercial plantings. **Frontiers in Plant Science**, 12:628769.

Almeida LS, Paiva Sobrinho S, Luz, PB, Caldeira DSA, Oliveira AJ, Oliveira, TC (2021) *Azospirillum brasilense* na produção de mudas de Tenta Carolina. **Research, Society and Development**, 10(1):e4210111469-e4210111469.

Andre RGB, Garcia, A (2015) Alguns aspectos climáticos do município de Jaboticabal-SP. **Nucleus**, 12(2):263-269.

Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, Elsas JDV, Vuurde JWV, Azevedo JL (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(10):4906-4914.

Barbosa JC, Maldonado Júnior W. (2015) **AgroEstat** - sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos - versão 1.1.0.711. Jaboticabal: UNESP.

Barry AL, Thornsberry C (1991) Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL., et al. **Manual of Clinical Microbiology** (5th ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology.

Campos TS, Patrício MP, Vieira GR, Souza AMBD, Santos CHB, Rigobelo EC, Pivetta, KFL (2023) Rhizobacteria in growth and quality of açai seedlings. **Ornamental Horticulture**, 29:208-215.

Cassán F et al. (2020). Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, 56:461-479.

Castro GLS, Rêgo MCF, Silvestre WVD, Batista TFV, Silva GB (2020) Açai palm seedling growth promotion by rhizobacteria inoculation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 51(1):205-216.

Cunha JDF, Alfenas AC, Silva AGD, Brandão IJ (2013) Potencial de rizobactérias no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). **Revista Árvore**, 37:211-218.

Felix FC, De Matos DCP, Lato LP, De Almeida Maggioni R, Nogueira AC (2021) *Azospirillum brasilense* inoculation on seed germination and initial growth of seedlings of native forest species. **Floresta**, 51(4):855-863.

Ferreira CM, Soares HM, Soares EV (2019) Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of the Total Environment**, 682:779-799.

Fukami J, Cerezini P, Hungria M (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **Amb Express**, 8(1):73.

Hashem A, Tabassum B, Abd_Allah EF (2019) *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 26(6):1291-1297.

Kondo YR, Primon AP, Fioreze ACDCL, Cruz, SPD (2020) Growth promotion of genetically improved *Pinus taeda* seedlings by inoculation with species of *Bacillus*. **Cerne**, 26:456-462.

Larraburu EE, Llorente BE (2015a) Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in in vitro rooting of pink lapacho. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 122:175-184.

Larraburu EE, Llorente BE (2015b) *Azospirillum brasilense* enhances in vitro rhizogenesis of *Handroanthus impetiginosus* (pink lapacho) in different culture media. **Annals of Forest Science**, 72(2):219-229.

Lima PR, Horbach MA, Dranski JAL, Ecco M, Malavasi MDM, Malavasi UC. (2014) Avaliação morfofisiológica em mudas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos durante a rustificação. **Floresta e Ambiente**, 21:316-326.

Llacsá LX, Solis-Castro RL, Mialhe E, García-Seminario R (2019) Metagenomic Analysis of the Bacterial and Fungal Community Associated to the Rhizosphere of *Tabebuia chrysantha* and *T. billbergii*. **Current Microbiology**, 76(9):1073-1080.

Lorenzi H (2020) **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 8 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 384 p.

Mariano RL et al. (2022) Antileishmanial Activity and Chemical Composition of Hydroalcoholic Extracts from Different Parts of *Handroanthus impetiginosus* (Ipê-Roxo). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 32(5):851-857.

Meena VS, Maurya BR, Meena SK, Meena RK, Kumar A, Verma JP, Singh NP. (2016) Can *Bacillus* species enhance nutrient availability in agricultural soils?. **Bacilli and Agrobiotechnology**, 367-395.

Miljaković D, Marinković J, Balešević-Tubić S (2020) The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**, 8(7):1037.

Missio EL (2016) Rizobactéria e polímero aplicados em sementes de *Jacaranda mimosifolia* d. Don promovem o crescimento das mudas. **Agrarian Academy**, 3(6).

Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33:1-16.

R Core Team (2013) **R: The R Project for Statistical Computing**. Retrieved from <www.r-project.org>

Rodrigues JIM, Silva JRS, Nascimento Filho MAV, Vieira LR, Oliveira FA, Barata GS, Martins WBR (2023) Eficiência do uso de bioestimulantes para a produção de mudas de Ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus* Mart.). **Advances in Forestry Science**, 10(4):2099-2107.

Rostamikia Y, Tabari Kouchaksaraei M, Asgharzadeh A, Rahmani A (2016) The effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on growth and physiological characteristics of *Corylus avellana* seedlings. **Ecopersia**, 4(3):1471-1479.

Sahm DF, Washington JA (1991) Antibacterial susceptibility tests: dilution methods. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. **Manual of clinical microbiology**. 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Salotti AH, Yarte ME, Larraburu EE (2023) Biotization with plant growth promoting bacteria in micropropagation of *Jacaranda mimosifolia*. **Trees**, 37(6):1757-1765.

Santos LCD, Azevedo LS, Siqueira EPD, Castro AHF, Lima LARDS (2023) Chemical characterization, antioxidant activity, and cytotoxicity of fatty acids methyl esters from *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) seeds. **Natural Product Research**, 1-5.

Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda MC, Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, 183:92-99.

Silva-Junior OB, Grattapaglia D, Novaes E, Collevatti RG (2018) Genome assembly of the Pink Ipê (*Handroanthus impetiginosus*, Bignoniaceae), a highly valued, ecologically keystone Neotropical timber forest tree. **Gigascience**, 7(1):gix125.

Souza AMB, Chioda LB, Ferreira KB, Vieira GR, Campos TS, Pivetta KFL (2022). Initial growth of *Syagrus romanzoffiana* seedlings in biosolid-based substrate. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 52:70577.

Stirbet A, Lazar D, Kromdijk J, Govindjee (2018) Chlorophyll a fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses?. **Photosynthetica**, 56(1):86-104.

Tarh A, Behera LK, Mehta AA, Huse SA, Garde YA, Dholariya CA (2023) Influence of biofertilizers on seedling growth and vigour of Indian redwood [*Soymida febrifuga* roxb.] - A lesser known tree species. **Indian Journal of Ecology**, 50(5):1373-1378.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2017) **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora.

Valle ACV, Carvalho AC, Rahme SW, Araújo ADRB, Malard PF, Brunel HSS (2023) Evaluation of cell viability and nitric oxide release after treatment of human hepatocellular carcinoma cells with a homeopathic compound of Graviola (*Annona muricata*) and Purple Ipe (*Handroanthus impetiginosus*) **Medical Research Archives**, 11(7):1-6.

Viana JVS, Fiedler NC, Capetine TB, Honório APA, Ramalho, AHC (2019) Sobrevivência e crescimento inicial de espécies arbóreas em áreas degradadas. **Agropecuária Científica no Semiárido**, 15(2):139-143.

Vieira FCS, Nahas E (2005) Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. **Microbiological Research**, 160(2):197-202.

Wollum AG (1983) **Cultural methods for soil microorganisms**. Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties, 9:781-802.

Yarte ME, Llorente BE, Larraburu EE (2022) Native putatively endophytic bacteria from *Handroanthus impetiginosus* improve its in vitro rooting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 151(2):265-274.

CAPÍTULO 4 – Teste de qualidade com uso de imagens de Raio-X e criopreservação em sementes de ipê-roxo

4.1 RESUMO

A análise de imagens de raio-X em sementes é uma técnica não destrutiva empregada para avaliar características internas das sementes sem comprometer sua viabilidade ou integridade. A criopreservação é um método de conservação a longo prazo, em que o material biológico é submetido à temperaturas extremamente baixas (-196°C). Logo, o objetivo deste estudo foi verificar o uso da técnica de imagens de raio-X na qualidade das sementes de ipê-roxo, como também avaliar a germinabilidade das sementes que foram submetidas à criopreservação pelo método de vitrificação. Foram obtidas imagens de raio-X de 216 sementes, sendo que, cada uma correspondeu à uma unidade experimental, sendo que, cada semente correspondeu uma unidade experimental que foi germinada em papel filtro à 25°C a fim de comparação e investigação dos resultados. Na criopreservação, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com sete tratamentos: T0) Controle (as sementes não foram imersas em nitrogênio líquido - NL nem em solução de vitrificação - PVS); T1) sementes acondicionadas em freezer a -80 °C; T2) sementes imersas em NL sem solução de vitrificação; T3) sementes imersas em PVS2 seguido de NL; T4) sementes imersas em PVS2 mais 1,0% de floroglucinol (PG) seguido de NL; T5) sementes imersas em PVS3 seguido de NL; T6) sementes imersas em solução de PVS3 mais 1,0% de PG seguido de NL; quatro repetições e 50 sementes por parcela. Após descongeladas e germinadas, foi avaliada a porcentagem de germinação e os dados biométricos das sementes. As imagens de raio-X revelaram que a desidratação foi a principal causa de anormalidade ou mortalidade nas sementes de ipê-roxo. A maior porcentagem de germinação foi obtida em freezer a -80°C e diretamente no NL sem uso de soluções de vitrificação.

4.2 INTRODUÇÃO

A arbórea *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, conhecida popularmente como ipê-roxo, pode atingir até 30 metros de altura e 80 cm de diâmetro do tronco, possui uma vasta distribuição em florestas tropicais sazonalmente secas,

abrangendo regiões da América do sul e da Mesoamérica (Lorenzi, 2020; Silva-Junior et al., 2018). No entanto, essa espécie foi categorizada pela lista da IUCN (2020) como ameaçada, devido ao aumento da exploração predatória humana, a qual vem resultando na redução de áreas naturais.

O principal meio de produção do ipé-roxo é a partir de sementes (Lorenzi, 2020). Logo, avanços contínuos no conhecimento sobre análise da qualidade das sementes devem ser abordados, como o uso da análise de imagens, por exemplo, que representa uma ferramenta com um potencial indiscutível para estudos básicos e aplicados. Essa técnica visa elucidar diversos aspectos do comportamento das sementes e aprimorar a metodologia para a avaliação de diferentes atributos da qualidade das sementes (Silva et al., 2014).

O raio-X é uma técnica que pode ser aplicada sem causar danos às sementes, permitindo que sejam conduzidos testes fisiológicos. Esses testes visam confrontar as observações da morfologia interna das sementes com as características das plântulas resultantes dos testes fisiológicos, sejam elas normais ou anormais (Gomes Junior e Duijn, 2017). Além disso, as imagens obtidas podem ser catalogadas, arquivadas e posteriormente utilizadas para estabelecer critérios de avaliação não subjetivos e padronizados, resultando em uma avaliação mais precisa do que aquela baseada apenas na observação visual humana (Dell'Aquila, 2007).

Para esta análise, o teor de água deve ser reduzido ao mínimo possível para que a água não interfira na absorção da radiação pelo tecido, resultando em imagens opacas (Medeiros et al., 2018). Assim, um baixo teor de água das sementes utilizadas no teste de raio-X é crucial para obter radiografias com maior detalhamento das estruturas internas da semente (Simak, 1991).

Além da análise da qualidade física e fisiológicas das sementes, técnicas que visam a conservação dessas sementes são imprescindíveis. A criopreservação é uma dessas técnicas que possibilita o armazenamento e a conservação a longo prazo de material vegetal, como sementes, pólen e tecidos (Gantait et al., 2016). Essa técnica desempenha um papel crucial na manutenção, preservação e desenvolvimento de estudos sobre espécies vegetais que enfrentam ameaças em seus habitats. Ao preservar o material biológico em nitrogênio líquido à temperaturas extremamente baixas, seja na fase líquida (-196 °C) ou na fase de vapor (-150 °C), a criopreservação

mantém as características originais do material e possibilita sua recuperação após o descongelamento (Engelmann e Dussert, 2012). Ao contrário de outras técnicas de armazenamento de curto prazo, a criopreservação oferece a vantagem de uma preservação duradoura de diversos materiais vegetais.

No entanto, devido à temperatura extremamente baixa do nitrogênio líquido, existe o risco de danos nos tecidos devido à formação de cristais de gelo intracelular. Assim, o uso de soluções crioprotetoras torna-se essencial para garantir a recuperação bem-sucedida de órgãos, tecidos e a regeneração de plantas após o processo de criopreservação (Vendrame e Faria, 2011). Além disso, a umidade das sementes deve ser inferior a 10% para evitar a formação de cristais de gelo intracelulares durante o processo de congelamento, o que causaria a ruptura e morte celular (Engelmann, 2011).

A vitrificação é a técnica mais amplamente utilizada em protocolos de criopreservação, devido à sua facilidade e eficiência. Não requer equipamentos sofisticados e apresenta alta taxa de recuperação e sobrevivência do material biológico criopreservado. Esta técnica utiliza soluções crioprotetoras altamente concentradas e pré-resfriadas à temperaturas muito baixas, resultando em soluções viscosas e estáveis resfriadas, que impedem a formação de cristais de gelo dentro das células e lesões que podem causar a morte celular e tecidual (Roque-Borda et al., 2021). Além disso, a vitrificação também limita a difusão de produtos dentro da célula, como água e outros substratos, induzindo um estado de quiescência metabólica. Isso resulta na prevenção de reações químicas dependentes do processo de difusão. Devido às propriedades do "estado vítreo" das soluções de vitrificação, é possível suprimir a deterioração do sistema biológico (Sakai e Engelmann, 2007)

O objetivo deste estudo foi verificar o uso da técnica de imagens de raio-X na qualidade das sementes de ipê-roxo, como também avaliar a germinabilidade das sementes que foram submetidas à criopreservação pelo método de vitrificação.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes da espécie *H. impetiginosus* foram coletadas de matrizes utilizadas na arborização urbana de Miami, no sul da Flórida (25°46'31" N 80°12'32" O). em maio de 2023. Esta área é de clima subtropical úmido, zona de resistência de plantas USDA

9a. A precipitação média anual é de 1.230 mm e as temperaturas variam entre um mínimo de 5,5 °C e um máximo de 32 °C. Foi avaliado o teor de água das sementes, o qual que determinado usando o método de estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas (Brasil, 2009). Foram utilizadas duas repetições de 2,0 g cada e os resultados foram expressos em porcentagem.

A teor de água inicial das sementes foi de 12,3% usada no teste de raio-X e, após um dia em dessecador, a umidade reduziu para 6,5% e foi usada no estudo de criopreservação.

4.3.1 Raio-X na qualidade das sementes

O experimento de qualidade de semente por raio-X foi conduzido no Laboratório de Biologia de Sementes da Universidade da Flórida, localizado em Gainesville, Flórida, EUA. Para a análise da morfologia interna das sementes foram utilizadas doze repetições de 18 sementes, totalizando 216 sementes. As amostras foram distribuídas em placas acrílicas transparentes, sendo todas as sementes distribuídas em posição similar e depois colocadas dentro do equipamento de raio-X digital 2D KUBTEC® XPERT® 80, configurado com um tempo de exposição à radiação de 20 segundos, voltagem de 20-90 kV, distância focal de 5 µm, e contraste de imagem calibrado em 49.5 µm. As imagens digitais geradas foram salvas em um computador no formato JPEG.

Na segunda parte do trabalho foi realizado o teste de germinação. Foi instalado usando o mesmo arranjo e sequência de sementes usado nas imagens de raio-X. Para esta etapa, as sementes foram distribuídas em papel filtro previamente umedecido com água destilada em uma proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel, dispostas em caixas acrílicas de plástico transparente e mantidas em uma câmara de germinação à uma temperatura de 25 °C. A porcentagem de germinação foi avaliada diariamente até a estabilização da germinação que se deu em 25 dias após a instalação do teste de germinação, com plântulas normais e anormais e sementes não germinadas sendo fotografadas e contadas.

4.3.2 Criopreservação na germinação de sementes

O experimento de criopreservação foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Horticultura Ambiental, em Gainesville, Flórida, EUA. O teor de água das sementes de ipê-roxo foi determinado usando o método de estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas (Brasil, 2009). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com sete tratamentos: T0) Controle (as sementes não foram imersas em nitrogênio líquido - NL nem em solução de vitrificação - PVS); T1) sementes acondicionadas em freezer a -80 °C; T2) sementes imersas em NL sem solução de vitrificação; T3) sementes imersas em PVS2 seguido de NL; T4) sementes imersas em PVS2 mais 1,0% de floroglucinol (PG) seguido de NL; T5) sementes imersas em PVS3 seguido de NL; T6) sementes imersas em solução de PVS3 mais 1,0% de PG seguido de NL; foram quatro repetições e 50 sementes por parcela.

Para os tratamentos de criopreservação, as sementes foram colocadas em tubos de centrífuga de polipropileno de 15 mL, contendo 15 mL de solução de glicerol a 2M por 60 minutos à 25 °C, conforme descrito por Nishizawa et al. (1993). Após 60 minutos, a solução de glicerol foi removida e as sementes foram imersas em soluções de vitrificação com ou sem adição de 1% de floroglucinol. Estas soluções de vitrificação são: PVS2 e PVS3, sendo a primeira composta por 30% (p/v) de glicerol, 15% (p/v) de etileno glicol, 15% (p/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4M de sacarose (Sakai et al., 1990), e a segunda composta por 5% de glicerol, 10% de etileno glicol (PEG), 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), 5% de ficoll e 0,20 mol L⁻¹ de sacarose (Mazur et al., 2008). As sementes foram imersas por 120 min na solução correspondente ao tratamento aplicado.

Após 30 dias em ultra freezer (T1) ou NL (demais tratamentos, exceto controle), os tubos foram removidos e rapidamente reaquecidos em um banho de água mantido à 39,7 °C, até o degelo da solução. Em seguida, as sementes foram enxaguadas em água destilada e colocadas para germinar. Foram realizados dois testes de germinação: 1) teste em papel filtro, umedecido com água destilada 2,5 vezes o seu peso, onde as sementes foram distribuídas sobre o papel e acondicionadas em caixa acrílica transparente; 2) teste em substrato composto de areia grossa, turfa e casca de pinus, em que foi semeada uma semente por célula em bandejas de polipropileno com 72 células. As caixas acrílicas e bandejas foram colocadas em incubadoras ajustadas para 25 °C (Brasil, 2013).

Foi avaliada no teste de papel filtro a taxa de germinação (%) por 14 dias e para o teste em substrato foram avaliados: germinação (%) e após 60 dias do início do teste foram mensuradas a altura da parte aérea (cm); comprimento radicular (cm), levando em consideração o comprimento da maior raiz, ambos obtidos com o auxílio de régua milimetrada; massa fresca e massa seca da parte aérea e das raízes, obtidas após a secagem em estufa com circulação forçada de ar à 70 °C até atingir peso constante, sendo posteriormente pesadas em balança de precisão de 0,001g (SHIMADZU®, modelo AY220) e os resultados expressos em gramas planta⁻¹. Foi determinado também o valor SPAD, com o aparelho ClorofiLOG, modelo CFL1030, marca FALKER®. A quantidade de cobertura verde formada pelas plantas foi obtida em imagens por planta, utilizando o aplicativo móvel Canopeo®. O celular contendo o aplicativo instalado foi mantido à 50 cm acima da copa e as fotos foram tiradas em sala com iluminação constante. Câmeras de celular de lente única foram usadas no experimento (equivalência de distância focal ~ 26 mm).

4.3.3 Procedimentos estatísticos

Os dados foram submetidos à análise de variância e, para dados com valores percentuais, foi aplicada uma transformação usando a $\arcsin(x/100) \sqrt{1/2}$. As médias foram comparadas usando o teste de Tukey com um nível de probabilidade de 5%. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico AgroEstat (Barbosa e Maldonado Júnior, 2015). Para execução dos bloxplot e as análises correlação de Spearman e de componentes principais foi utilizado o software R, versão 3.5.1 (R Core Team, 2018).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Raio-X na qualidade das sementes

As imagens correspondentes às sementes radiografadas e as etapas da germinação da semente até a formação de plântulas, são mostradas na Figura 3.1. Observa-se que foi realizado o rastreamento de cada semente individualmente durante todo o processo de germinação.

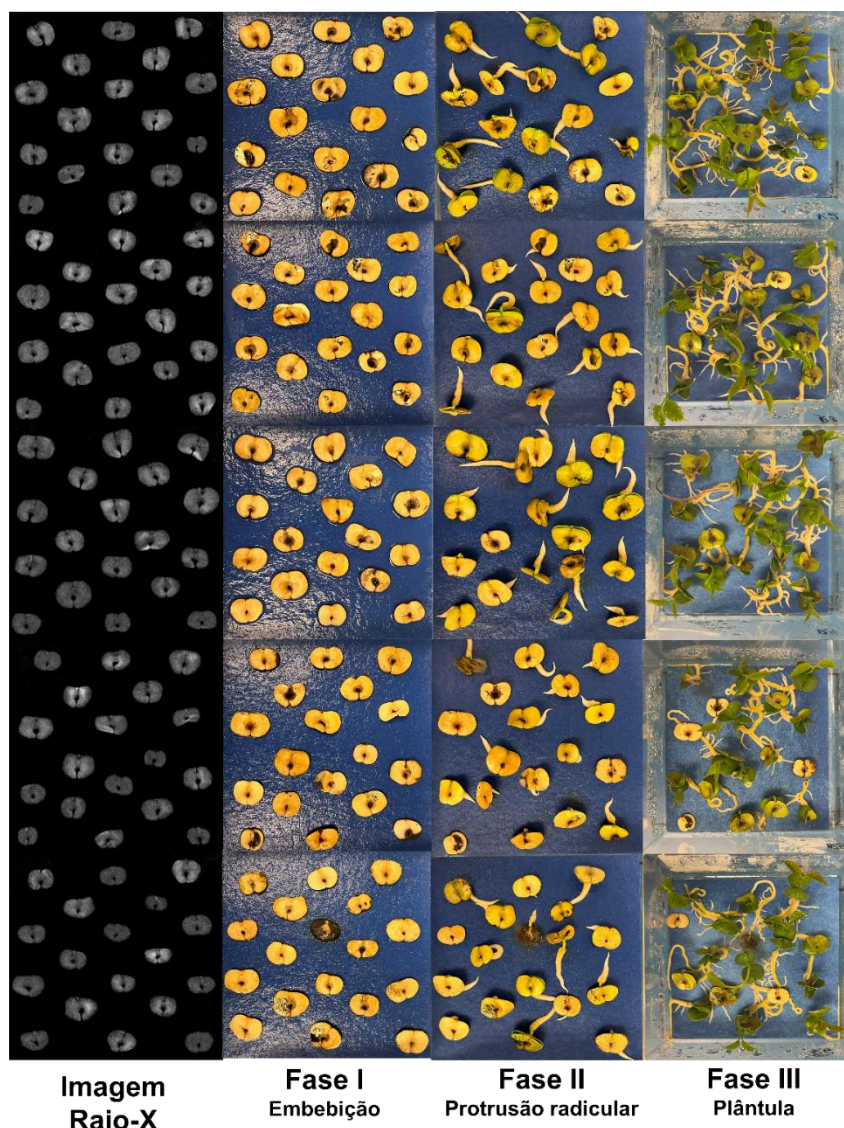


Figura 3.1. Imagens Raio-X e fases do desenvolvimento da germinação de *Handroanthus impetiginosus* para rastreamento do comportamento de cada semente individualmente.

Comparando então a Figura 3.2A com as demais, foi possível identificar os danos internos da semente, em que, na Figura 3.2B, os dois cotilédones delgados e foliáceos são visualizados sobrepostos; na Figura 3.2C, o eixo hipocótilo-radícula aparece com danos, já que sua forma reta facilmente identificada na imagem radiografada da Figura 2A, não se mostra da mesma forma na Figura 3.2A e; na Figura 3.2D não se observa turgidez da semente comparado às demais imagens, sendo que esta coloração opaca e a difícil identificação das estruturas internas da semente está associada a desidratação severa da mesma.

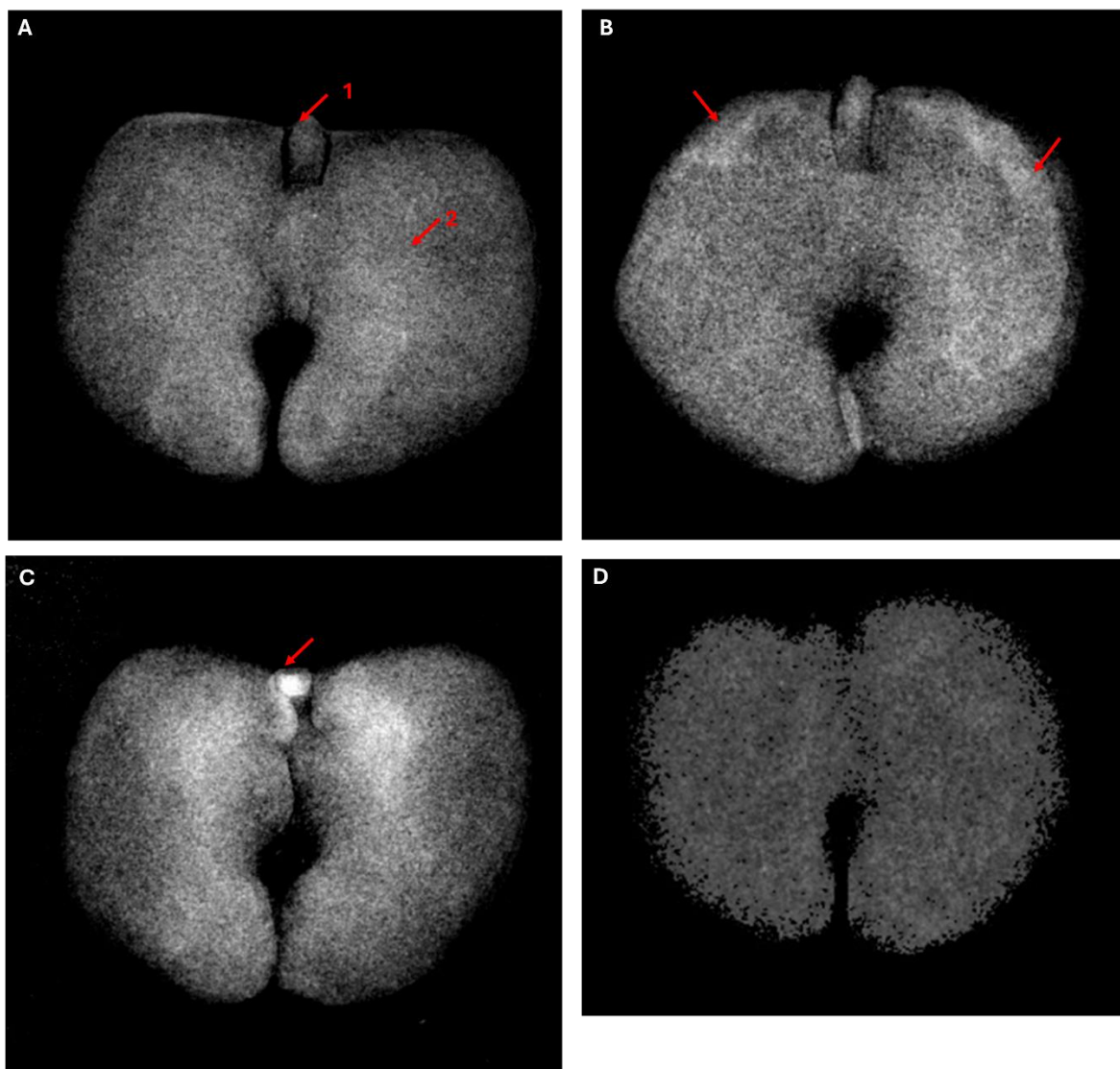


Figura 3.2. Imagem Raio-X de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. A) semente normal; em destaque a seta 1 - indica o embrião isolado evidenciando o eixo hipocótilo-radícula; Seta 2 – cotilédone bilobado; B) destaque dos danos no cotilédone; C) dano no hipocótilo-radícula destacado pela coloração esbranquiçada; D) sementes com sinais de desidratação severa.

As sementes possuem naturalmente um nível de tolerância à dessecação, no entanto quando desidratadas além desses limites, várias consequências podem ser observadas, entre elas: o aumento na concentração dos solutos intracelulares, o que pode levar à reações químicas destrutivas intensificadas; alguns solutos podem cristalizar, o que pode iniciar a desnaturação de proteínas e a ruptura das membranas celulares e, com isso, o processo de embebição das sementes é danificado, causando

danos irreversíveis ou a morte da semente (Guimarães et al., 2011; Pereira et al., 2014).

A comparação da resposta do teste de germinação às imagens captadas no equipamento de raio-X pode ser observada na Figura 3.3. A abordagem permitiu a visualização das condições internas de cada semente, sem causar danos, possibilitando assim a identificação de relações de causa e efeito após o teste de germinação ter sido concluído.

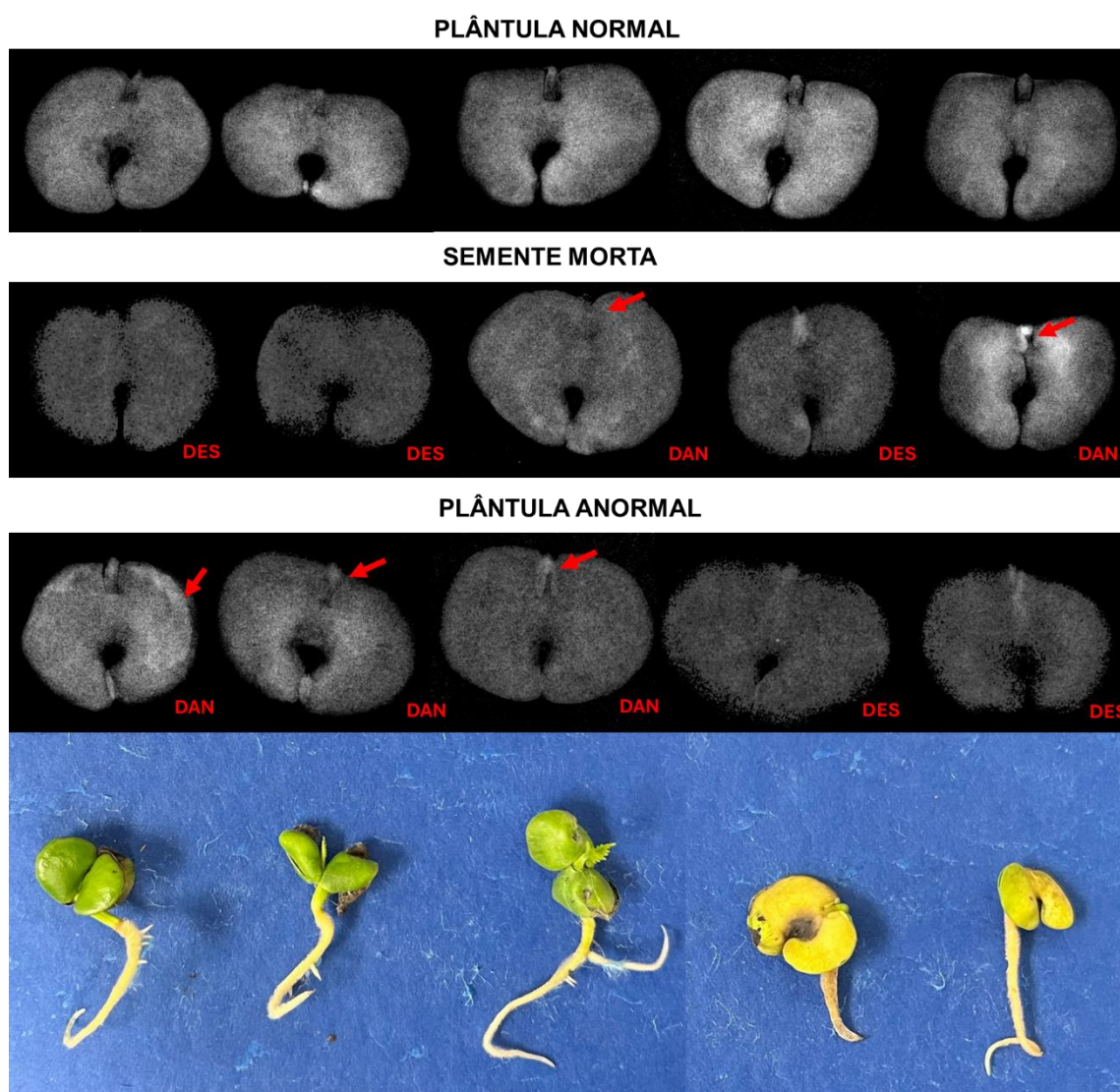


Figura 3.3. Imagens Raio-X e plântulas anormais de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. DES – semente com desidratação severa. DAN – semente com dano(s) ou ausência de estrutura principal.

O primeiro grupo (plântula normal) de sementes correspondeu à sementes inteiras, sem danos ou com danos leves, as quais contribuíram para um efeito positivo

na germinação com o desenvolvimento de plântulas normais, onde foram identificadas todas as estruturas morfológicas presentes e bem desenvolvidas de acordo com Felix et al. (2018). O segundo grupo de imagens (semente morta), caracterizam as sementes que não germinaram pela ausência e dano grave do eixo hipocótilo-radícula e pela desidratação. O terceiro grupo (plântula anormal) mostra danos intermediários nas estruturas, sendo possível visualizar como foi realizada a associação individual das imagens por cada indivíduo de plântula (Figura 3.3). Foram identificadas na amostra com 216 sementes, 77,5% de plântulas normais, 16% de plântulas anormais e 6,5% de sementes mortas. Sementes completas também resultaram em sementes não germinadas após o teste de germinação.

Resultados corroboram com o observado por Gomes et al. (2016), em que o teste de raio-X demonstrou ser eficaz na avaliação da morfologia interna das sementes de *Platypodium elegans* Vog. As imagens de raio-X também foram eficientes na avaliação interna da morfologia de sementes de *Leucaena leucocephala* Lam. quando comparadas com a germinação (Medeiros et al., 2018). Pinheiro et al. (2022) também estabeleceu uma relação entre a qualidade física e fisiológica das sementes de *Anadenanthera peregrina* (L) Speg.

O processamento das imagens para o ipê-roxo apresentou algumas dificuldades, especialmente devido à forma achatada das sementes. Isso resultou em uma visualização menos nítida de algumas estruturas para algumas sementes. Pinheiro et al. (2022) também encontrou limitações na identificação de estrutura de sementes com uso da imagem de raio-X.

4.4.2 Criopreservação de sementes

Para avaliação da eficiência da criopreservação, as sementes foram removidas do nitrogênio líquido, descongeladas e colocadas para germinar por 21 dias, quando foram observadas as porcentagens máximas de germinação (Brasil, 2013). Para a germinação em papel não houve diferença entre T0, T1 e T2, onde a germinação média foi de 90% e, as menores taxas foram observadas em T4 (35%) e T5 (44%) (Figura 3.4A). Na germinação em substrato, observou-se o aumento da germinação para todos os tratamentos comparado ao teste em papel. Não foram observadas diferenças entre T0, T1, T2 e T6, todos com média de 96% de germinação, sendo superiores aos demais tratamentos (Figura 3.4B).

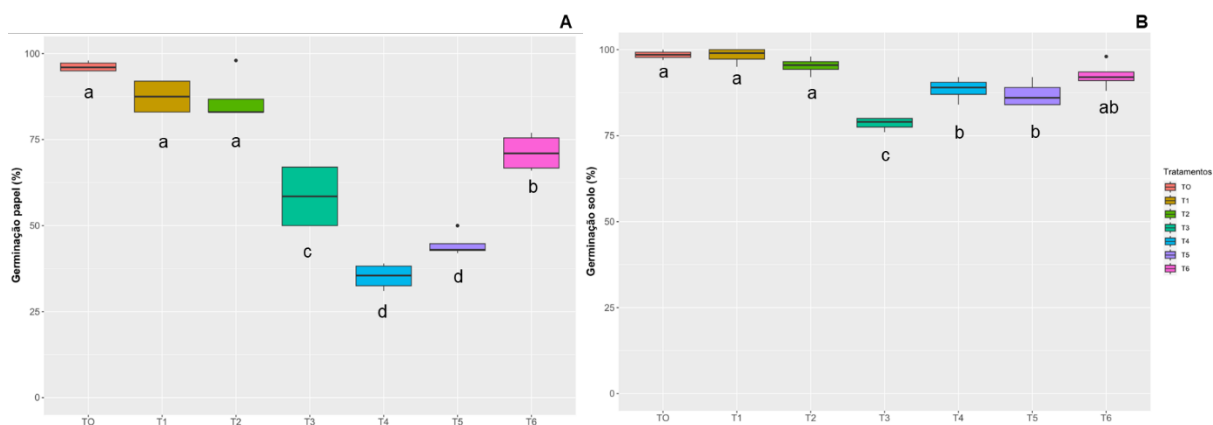


Figura 3.4. Germinação (%) de sementes criopreservadas de *Handroanthus impetiginosus*, pré-tratadas com soluções crioprotetoras, após 30 dias de recuperação. A) Germinação em papel. B) Germinação em substrato. **T0- Controle: sem crioprotetores (sem glicerol, sem PVS2 ou 3, sem floroglucinol, sem NL, sem freezer); T1) acondicionadas em freezer a -80°C T2) imersas em NL sem solução de vitrificação; T3) imersas em PVS2 (30 min) seguido de NL; T4) imersas em PVS2 (30 min) mais 1,0% de floroglucinol (PG) seguido de NL; T5) imersas em PVS3 (30 min) seguido de NL e T6) imersas em PVS3 (30 min) mais 1,0% de PG seguido de NL.

As diferenças entre os resultados dos testes de germinação podem ser explicadas pelo maior contato dos tratamentos com a semente no papel, enquanto que, no teste com substrato o mesmo permite a lixiviação das soluções, reduzindo a toxicidade durante a germinação. O uso do floroglucinol é recorrente na criopreservação de tecidos vegetais, pois exibe características que se assemelham tanto às citocininas quanto às auxinas, manifestando propriedades comparáveis ao tidiazuron (Silva et al., 2013). No entanto, o uso do floroglucinol não reduziu essa toxicidade na criopreservação de sementes de ipê-roxo.

A criopreservação com teor de água de 6,5%, também foi eficiente para a semente de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Salomão et al., 2020). Pesquisas também compararam o uso de outras temperaturas negativas com o uso do nitrogênio líquido. Oliveira et al. (2021) testou 20 espécies de *Tillandsia* sp. e observaram que o resfriamento a -5°C não preservou as sementes, já o uso do NL (-196°C) preservou as sementes, mantendo sua viabilidade. Não houve diferença na porcentagem de germinação de sementes de *Handroanthus spongiosus* armazenadas 30 dias no freezer (-20°C) ou em NL, sendo ambas temperaturas recomendadas na criopreservação dessa espécie. (Silva et al., 2022). As sementes ortodoxas, como no caso das sementes de ipê-roxo, têm a capacidade de tolerar a secagem até baixo teor

de umidade sem danificar seu metabolismo, além de preservar sua integridade durante o armazenamento a frio de longo prazo. Entretanto, essas sementes permitem o potencial de conservação dentro de certos limites de temperatura (Vendrame et al., 2020).

Resultados semelhantes foram reportados no estudo de Velasco-García et al. (2022), em que o congelamento direto das sementes de *Cedrela odorata* L. sem qualquer agente vitrificante (PSV2 e PSV3), emergiu como o protocolo mais eficaz para preservar sua capacidade germinativa. As sementes de *Astronium urundeuva* M. Allemão Engl. também podem ser criopreservadas em NL sem crioprotetores (PVS2; PVS2 + 1% floroglucinol e PVS3) (Paula et al., 2022a). Os mesmos resultados foram encontrados para sementes de *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore (Stegani et al., 2017). No entanto, a solução de PVS2 foi eficiente na criopreservação de *Quercus variabilis* em NL (Zhang et al., 2023), assim como o uso de PVS2 e PVS2 + PG em sementes de *Miltonia flavescens* (Paula et al., 2020).

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para o valor SPAD (Figura 3.5A). Para área foliar (Canopeo), os tratamentos T1 e T2 foram superiores aos demais (Figura 3.5B). A altura foi afetada independente da solução de criopreservação utilizada (T3, T4, T5 e T6), com redução média de 36% quando comparado com o T0, T1 e T2. Já entre os tratamentos T1 (15,7cm), T2 (14,5 cm) e T3 (15,8 cm), não houve diferença entre si (Figura 5C). Para o comprimento de raiz, os tratamentos T0, T1, T2, T3 e T5, não diferiram entre si, entretanto, apenas o T0 foi superior ao T4 e ao T6 (Figura 5D).

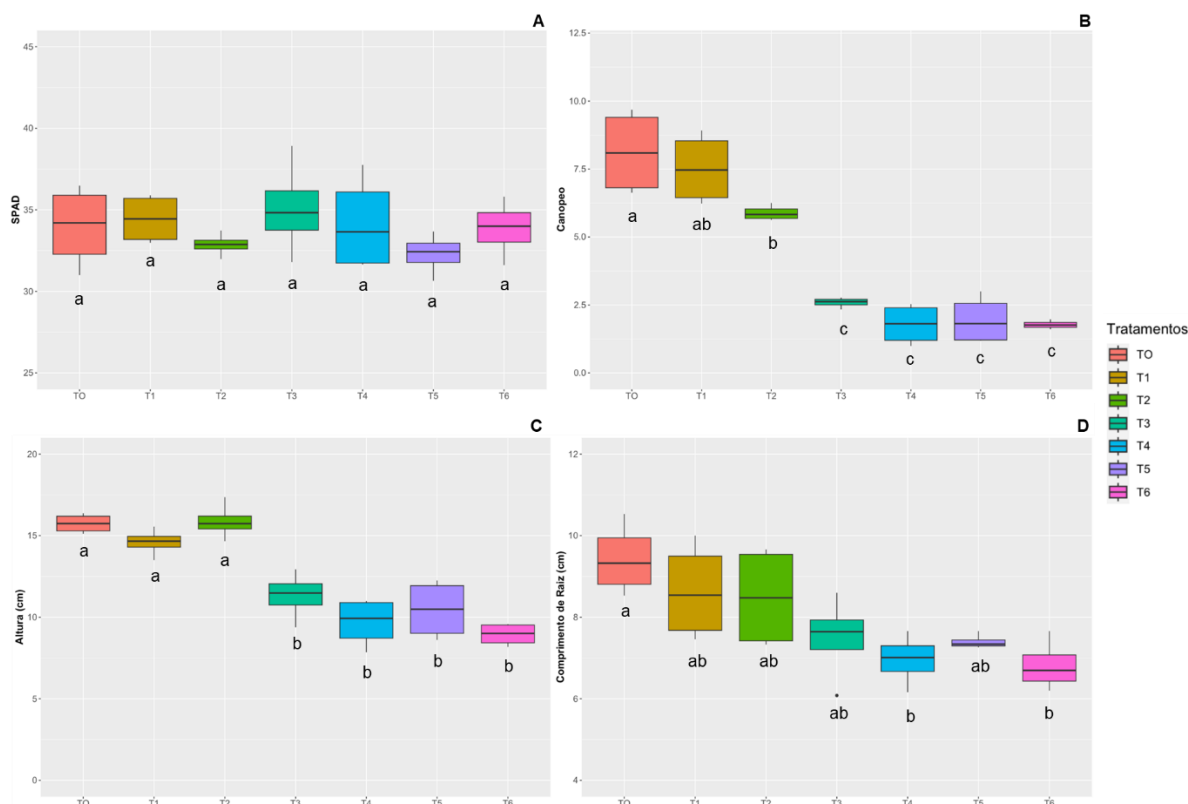


Figura 3.5. Avaliações de sementes criopreservadas de *Handroanthus impetiginosus*, pré-tratadas com soluções crioprotetoras, após 30 dias de recuperação. A) SPAD. B) Canoeiro. C) Altura (cm). D) Comprimento de raiz. **T0-Controle: sem crioprotetores (sem glicerol, sem PVS2, sem floroglucinol, sem NL, sem freezer); T1) acondicionadas em freezer a -80°C; T2) imersas em NL sem solução de vitrificação; T3) imersas em PVS2 (30 min) seguido de NL; T4) imersas em PVS2 (30 min) mais 1,0% de floroglucinol (PG) seguido de NL; T5) imersas em PVS3 (30 min) seguido de NL e T6) imersas em PVS3 (30 min) mais 1,0% de PG seguido de NL.

O uso de PVS2 e PVS3 também reduziram a altura das plântulas de *Cedrela odorata* L. (Velasco-García et al., 2022). O uso de PVS1; PVS2; PVS3; PVS2 + 1% phloroglucinol afetou negativamente a altura, o comprimento de raiz e a massa seca total na espécie *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore (Stegani et al., 2017). A criopreservação de *Genipa americana* L. em NL manteve a germinação das espécies, no entanto, o tratamento de frio reduziu a altura e o comprimento da raiz (Souza et al., 2023).

Na avaliação da massa fresca da parte aérea (Figura 3.6A) e da raiz (Figura 3.6C) o tratamento controle (T0) foi superior aos demais, com médias de 2,057 g e 1,004 g, respectivamente, seguido, pelos tratamentos T2 e T1. Observando a massa seca da parte aérea (Figura 6B), os tratamentos T0, T1 e T2 não diferiram entre si,

com média de 0,426 g, sendo superiores aos demais tratamentos (T3, T4, T5 e T6), os quais reduziram a massa seca da parte aérea em 48%, 74%, 73% e 62%, respectivamente, quando comparados ao T2, quando usado o NL sem imersão nas soluções. Já a massa seca da raiz dos tratamentos T0 e T2 foram melhores que os demais e não diferiram entre si, com média de 0,145 g, seguidos do T1 (Figura 3.6B). Contudo, os tratamentos T3, T4, T5 e T6 também tiveram sua massa seca da raiz reduzida quando comparados ao T2 em 48%, 68%, 64% e 76% (Figura 3.6D), respectivamente.. aos). Na.

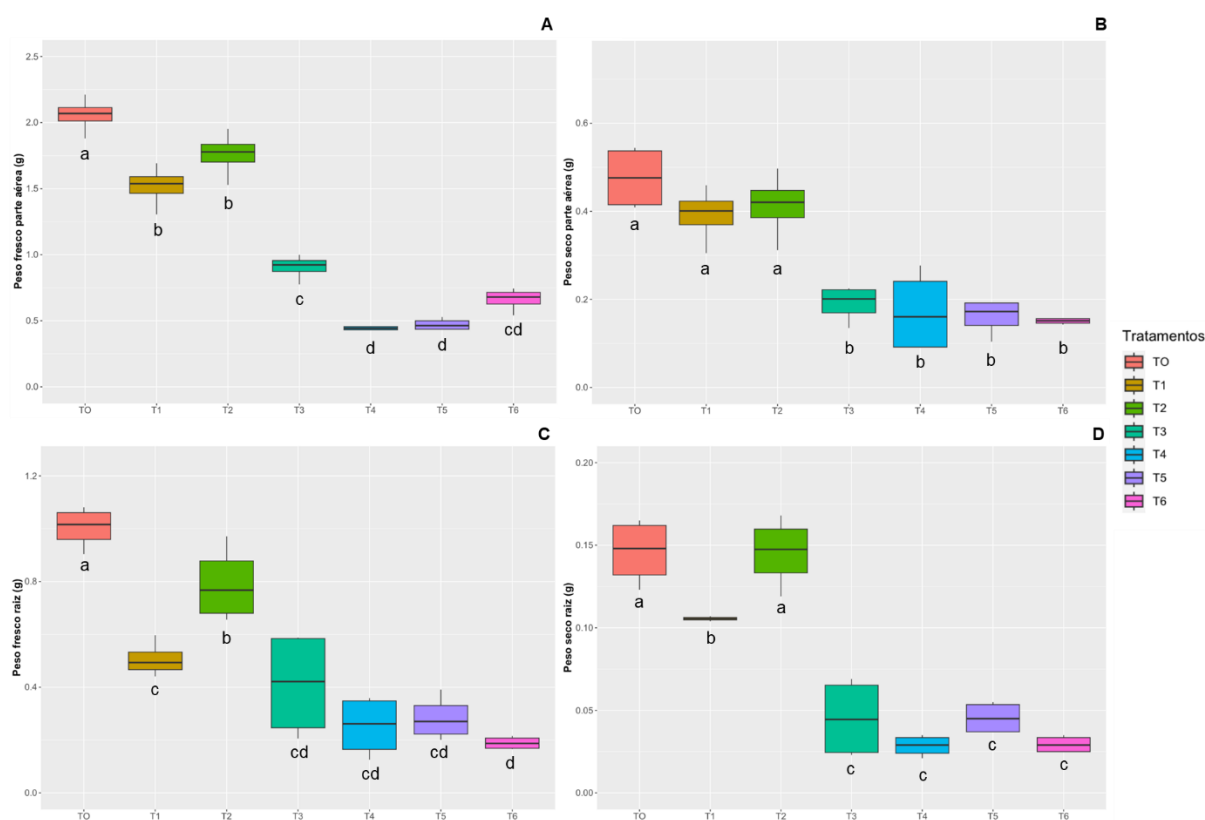


Figura 3.6. Avaliações de sementes criopreservadas de *Handroanthus impetiginosus*, pré-tratadas com soluções crioprotetoras, após 30 dias de recuperação. A) Massa fresca da parte aérea (g). B) Massa seca da parte aérea. C) Massa fresca da raiz (g). D) Massa seca da raiz. **T0-Controle: sem crioprotetores (sem glicerol, sem PVS2, sem floroglucinol, sem NL, sem freezer); T1) acondicionadas em freezer a -80°C; T2) imersas em LN sem solução de vitrificação; T3) imersas em PVS2 (30 min) seguido de NL; T4) imersas em PVS2 (30 min) mais 1,0% de floroglucinol (PG) seguido de NL; T5) imersas em PVS3 (30 min) seguido de NL e T6) imersas em PVS3 (30 min) mais 1,0% de PG seguido de NL.

A altura, o comprimento da raiz, a massa seca da raiz e a massa seca da parte aérea não apresentaram diferenças entre plântulas de *Astronium urundeuva* M.

Allemao Engl. com a imersão ou não de soluções crioprotetoras (PVS2; PVS2 + 1% floroglucinol e PVS3) expostas ao NL (Paula et al., 2022a). Paula et al., (2022b) indicaram que o uso dos crioprotetores PVS1, PVS2, PVS2 + 1 % floroglucinol ou PVS3 mantiveram a massa seca da parte aérea e da raiz de *Dyckia walteriana* inalteradas quando expostas ao NL. Já Santana et al. (2024) indicaram que o crioprotetor PVS2 aumentou a biomassa das plântulas de *Hylocereus costaricensis*, pois a solução reduziu os estresses oxidativos causados pelo contato prolongado ao NL.

Analisando a matriz de correlação de Spearman (Figura 3.7), foram encontradas correlações positivas e negativas significativas entre as características. Para os traços da germinação e do desenvolvimento das plântulas, os maiores valores de correlação positiva (acima de 0,80) foram observados para canopeo, altura da parte aérea, massa fresca da parte aérea e da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz.

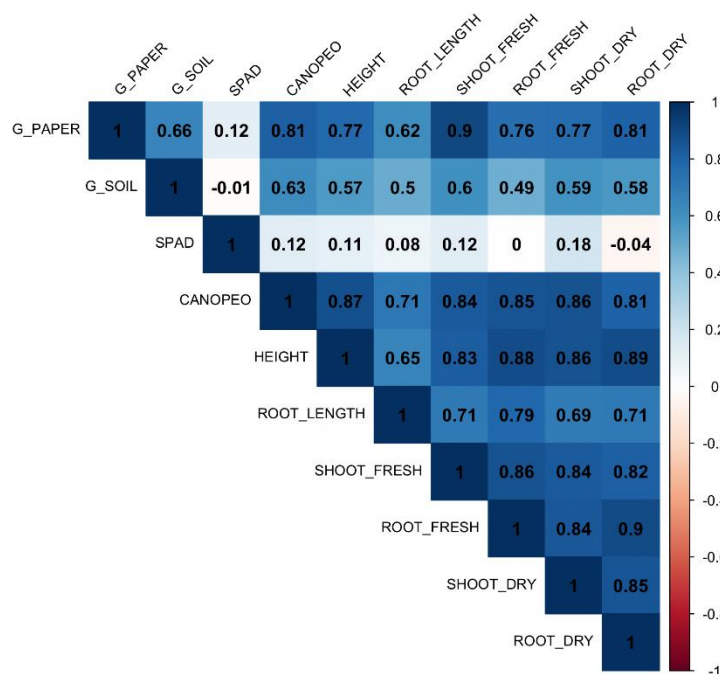


Figura 3.7. Matriz de correlação de Spearman entre as variáveis analisadas de ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Significativo a 5% de probabilidade. Onde: G_PAPER = germinação em papel; G_SOIL = germinação no substrato; SPAD; CANOPEO; HEIGHT = altura da parte aérea; ROOT_LENGTH = comprimento da raiz; SHOOT_FRESH = massa fresca da parte aérea; ROOT_FRESH = massa fresca da raiz; SHOOT_DRY = massa seca da parte aérea; ROOT_DRY = massa seca da raiz.

Considerando a análise multivariada, para os tratamentos de criopreservação a variação média explicada pelas variáveis canônicas 1 e 2 foi de 82,35% da variância total (Figura 3.8). A análise de componentes principais separa os dados em dois clusters, com os tratamentos T1 e T2 apresentando comportamento similar ao controle (T0), enquanto os tratamentos de T3 a T6 formam um grupo separado. Observa-se que todas as variáveis de crescimento analisadas exceto SPAD, difere T0, T1 e T2 dos demais tratamentos. Logo demonstra que a criopreservação das sementes não necessita de soluções de criopreservação para que haja o efeito de armazenamento a longo prazo desejado, pois a utilização dessas soluções interfere no desenvolvimento normal das plântulas.

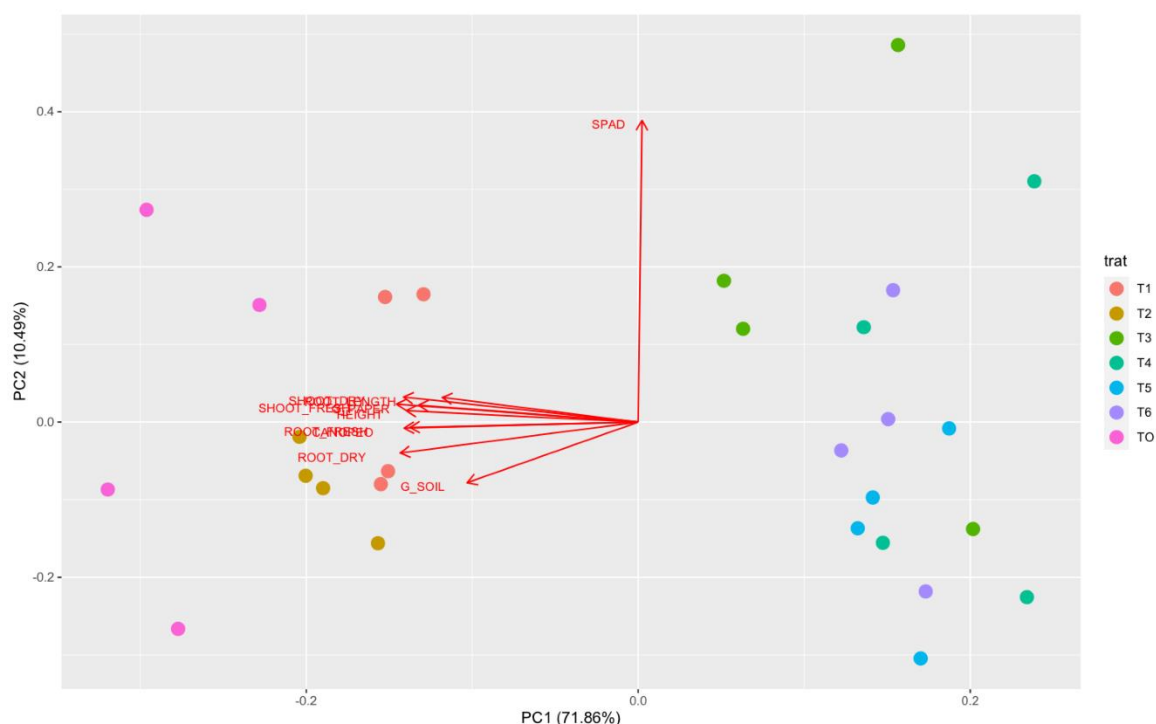


Figura 3.8. Análise de componentes principais pela dispersão dos tratamentos de criopreservação e as variáveis analisadas. Onde: T0-Controle: sem crioprotetores (sem glicerol, sem PVS2, sem floroglucinol, sem NL, sem freezer); T1) acondicionadas em freezer a -80°C ; T2) imersas em NL sem solução de vitrificação; T3) imersas em PVS2 (30 min) seguido de NL; T4) imersas em PVS2 (30 min) mais 1,0% de floroglucinol (PG) seguido de NL; T5) imersas em PVS3 (30 min) seguido de NL e T6) imersas em PVS3 (30 min) mais 1,0% de PG seguido de NL. G_PAPER = germinação em papel; G_SOIL = germinação no substrato; SPAD; CANOPEO; HEIGHT = altura da parte aérea; ROOT_LENGTH = comprimento da raiz; SHOOT_FRESH = massa fresca da parte aérea; ROOT_FRESH = massa fresca da raiz; SHOOT_DRY = massa seca da parte aérea; ROOT_DRY = massa seca da raiz.

As soluções PVS2 e PVS3 são hipertônicas, o que pode causar estresse osmótico às células, levando à desidratação e danos às membranas celulares, além de poder afetar a capacidade de manutenção da homeostase e/ou causar lesões diretas na célula (Best, 2015). Porém, apesar dos efeitos tóxicos das soluções serem amplamente reconhecidos, as alterações provocadas pelas soluções crioprotetoras ainda carecem de uma explicação abrangente (Fahy et al., 2004). Existe uma desconexão entre a literatura que explora os efeitos bioquímicos dos crioprotetores e aquela que investiga seus efeitos tóxicos em aplicações criobiológicas (Fahy e Wowk, 2015).

A avaliação conjunta da germinação no papel e no substrato permitiu identificar a toxicidade das soluções crioprotetoras. Portanto, é possível constatar que a criopreservação das sementes de ipê-roxo sem o uso de soluções de vitrificação destaca a simplicidade e eficácia desse método, contornando a necessidade de processos adicionais que poderiam potencialmente comprometer a viabilidade das sementes.

4.5 CONCLUSÕES

O uso da técnica de imagens de raio-X é promissora na avaliação da qualidade das sementes.

Os resultados indicam que o uso de soluções de vitrificação não é necessário para a criopreservação das sementes de ipê-roxo. A imersão das sementes direto em nitrogênio líquido permitiu a recuperação das plântulas sem interferência no desenvolvimento.

4.6 AGRADECIMENTOS E APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores declaram ainda que não há conflito de interesses na pesquisa e publicação do manuscrito

4.7 REFERÊNCIAS

Barbosa JC, Maldonado Júnior W (2015) **AgroEstat** - sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos - versão 1.1.0.711. Jaboticabal: UNESP, p. 396.

Best BP (2015) Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. **Rejuvenation research**, 18(5):422-436.

Brasil (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - **Regras para Análise de Sementes** Brasília: MAPA.

Brasil (2013) – **Instruções para a análise de sementes de espécies florestais** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Defesa Agropecuária Brasília: MAPA/ACS, 98 p.

Dell'aquila A (2007) Towards new computer imaging techniques applied to seed quality testing and sorting. **Seed Science and Technology**, 35(3):519-538.

Engelmann, F (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 47:5-16.

Engelmann F, Dussert, S (2012) **Conservation of tropical plant species** New York, NY: Springer New York, 107-119p.

Fahy GM, Wowk B (2015) Principles of cryopreservation by vitrification. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**, 21-82.

Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S (2004) Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, 48(1):22-35.

Felix FC, Medeiros JA, Pacheco MV (2018) Morfologia de sementes e plântulas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart ex DC) Mattos. **Revista de Ciências Agrárias**, 41(4):1028-1035.

Gantait S, Kundu S, Wani SH, Das PK (2016) Cryopreservation of forest tree seeds: A mini-review. **Journal of Forest and Environmental Science**, 32(3):311-322.

Gomes KBP, Matos JMM, Martins IS, Martins RCC (2016) X-ray test to evaluate the physiological potencial of *Platypodium elegans* Vog Seeds (Fabaceae). **Scientia Agropecuaria**, 7(3):305-311.

Gomes Junior FG, Duijn BV (2017) Three-dimensional (3-D) X-ray imaging for seed analysis. **Seed Testing International**, 154:48-52.

Guimarães CC, Faria JMR, Oliveira JM, Silva EAAD (2011) Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, 33: 207-215.

IUCN (2020) **The Red List of Threatened Species BGCI**, Tree Specialist Group *Handroanthus impetiginosus*, 2020 Available at <https://www.iucnredlistorg/species/144297143/173394208> Accessed on: 20 Jan 2024

Lorenzi, H (2020) **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil 8 ed Nova Odessa: Instituto Plantarum, 384p.

Mazur P, Leibo SP, Seidel Júnior GE (2008) Vitrification and ultra-rapid freezing of oocytes In: **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols** Humana Press, p.3-17.

Medeiros ADD, Araújo JDO, León MJZ, Silva LJD, Dias DCFDS (2018) Parameters based on X-ray images to assess the physical and physiological quality of *Leucaena leucocephala* seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, 42:643-652.

Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T (1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, 91(1):67-73.

Oliveira RS, Souza FVD, Santos IL, Souza SDO, Aona LYS, Souza EH (2021) Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Tillandsia* species (Bromeliaceae) with ornamental potential. **3 Biotech**, 11(4):186.

Paula JCB, Guariz HR, Ribeiro Júnior WA, Shimizu GD, Faria RT, Oliveira HC (2022a) Cryopreservation of seeds of the Brazilian native species Aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva* M Allemão Engl). **Revista Caatinga**, 35:915-924.

Paula JCB, Ribeiro Júnior WAR, Shimizu GD, Faria RT (2022b) Criopreservação de sementes de espécies brasileiras do gênero *Dyckia* (Bromeliaceae). **Iheringia**, Série Botânica, 77.

Paula JCB, Ribeiro Júnior WAR, Shimizu GD, Men GB, Faria RT (2020) Cryopreservation in liquid nitrogen of Brazilian orchid seeds *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Agro@mbiente** On-line, 14.

Pereira WVS, Faria JMR, Tonetti OAO, Silva EAA (2014) Perda da tolerância à dessecação em sementes de *Copaifera langsdorffii* durante a germinação. **Brazilian Journal of Biology**, 74:501-508.

Pimenta JMA, Souza WMATD, Ferrari CDS, Vieira FDA, Fajardo CG, Pacheco MV (2023) Selection of *Handroanthus impetiginosus* mother trees to support seed collection areas. **Revista Árvore**, 47:e4706.

Pinheiro DT, Medeiros AD, Santos Neri Soares TF, Pereira Capobianco N, Dias DCTF (2022) Image analysis using X-ray to evaluate seed quality of *Anadenanthera peregrina* (L) Speg. **Ciência Florestal** (01039954):32(3).

R core team (2018) **R: A language and environment for statistical computing** R Foundation for Statistical Computing, Austria.

Roque-Borda CA, Kulus D, Souza AV, Kaviani B, Vicente EF (2021) Cryopreservation of agronomic plant germplasm using vitrification-based methods: An overview of selected case studies. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(11):6157.

Sakai A, Engelmann F (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, 28(3):151-172.

Sakai A, Kobayashi S, Oiyama, I (1990) Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196 C. **Journal of Plant Physiology**, 137(4):465-470.

Salomão AN, Santos IRI, José SCBR (2020) Cryopreservation of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers seeds. **Hoehnea**, 47: e1042019.

Santana BÍD, Paiva R, Reis MVD, Vilas-Boas LV, Matos EM Campos, JMDS (2024) Seed cryopreservation without vitrification (PVS2) induces oxidative stimuli to promote endoreplication in red pitaya seedlings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 156(1):11.

Silva JAT, Dobránszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 49: 1-16.

Silva JDJ, Alencar SDS, Gomes RA, Matias JR, Pelacani CR, Dantas BF (2022) Conservation and physiological quality of *Handroanthus spongiosus* (Rizzini) S Grose (Bignoniaceae) seeds. **Journal of Seed Science**, 44:e202244007.

Silva PP, Freitas RA, Cícero SM, Marcos Filho J, Nascimento WM (2014) Image analysis to associate morphological and physiological characteristics in pumpkin seeds. **Horticultura Brasileira**, 32:210-214.

Silva-Junior OB, Grattapaglia D, Novaes E, Collevatti RG (2018) Genome assembly of the Pink Ipê (*Handroanthus impetiginosus*, Bignoniaceae), a highly valued, ecologically keystone Neotropical timber forest tree. **Gigascience**, 7(1):gix125.

Simak, M (1991) **Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography**. Tree and shrub seed handbook, 1,1-28.

Souza, R R D, Paiva, P D D O, Freitas, R T D, Silva, D P C D, Reis, M V D, Nery, F C, Paiva, R (2023) Cryopreservation of *Genipa americana* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, 54:e20228531.

Stegani V, Alves GAC, Bertoni DJ, Faria RTV (2017) Criopreservação de sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*). **Ornamental Horticulture**, 23:15-21.

Velasco-García MV, Hernández-Arroyo DG, Muñoz-Gutiérrez L, Castillo-Martínez C R, Vallejo-Reyna MÁ, García-Campusano F (2022) Seed cryopreservation of *Cedrela odorata* L: germination and early nursery establishment. **Revista Mexicana de Ciencias Forestales**, 13(69):31-55.

Vendrame W, Takane R, Cardoso L, Alvarez L, Tadeu R (2020) Cryopreservation of seeds of *Melocactus zehntneri* Braun ex Ritter f and *Cereus gounellei* Luetzelb ex Schum k by the vitrification method. **Agronomy Science and Biotechnology**, 6:1-7.

Vendrame WA, Faria RT (2011) Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**, 128(2):131-135.

Zhang MJ, Wang YZ, Xian Y, Cui CC, Xie XM, Tong BQ, Han B (2023) Desiccation Sensitivity Characteristics and Low-Temperature Storage of Recalcitrant *Quercus variabilis*. **Seed Forests**, 14(9):1837.