

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**YASMIM SMARSARO BONFÁ**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Cedrela fissilis* VELL.  
UMA ESPÉCIE ARBÓREA BRASILEIRA AMEAÇADA DE  
EXTINÇÃO**

VITÓRIA – ES

2019

YASMIM SMARSARO BONFÁ

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Cedrela fissilis* VELL.  
UMA ESPÉCIE ARBÓREA BRASILEIRA AMEAÇADA DE  
EXTINÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos exigidos, para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof. Dr. ELIAS TERRA WERNER

VITÓRIA – ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

B713p Bonfá, Yasmim Smarsaro, 1990-  
Propagação in vitro de Cedrela fissilis VELL., uma espécie arbórea brasileira ameaçada de extinção. / Yasmim Smarsaro Bonfá. - 2019.  
54 f. : il.

Orientador: Elias Terra Werner.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Propagação in vitro. 2. Micropropagação. 3. Cedro-rosa. 4. Regulador de crescimento. 5. Segmento cotiledonar. I. Werner, Elias Terra. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

---

Yasmim Smarsaro Bonfá

**“PROPAGAÇÃO IN VITRO DE Cedrela fissilis VELL., UMA ESPÉCIE ARBÓREA BRASILEIRA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO”.**

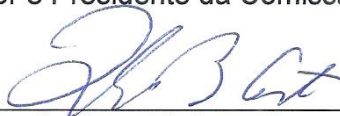
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2019.

Comissão Examinadora:



**Prof. Dr. Elias Terra Werner (UFES)**  
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora



**Profa. Dra. Viviana Borges Corte (UFES)**  
Examinadora Titular Interna



**Profa. Dra. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo (CEUNES)**  
Examinadora Titular Externa

## AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força, proteção, coragem, fé e esperança;

À minha família por todo apoio, incentivo e suporte;

Aos meus amigos por entenderem minhas ausências e sumiços, por me apoiarem e terem orgulho de mim;

Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Elias Terra Werner;

Aos Professores Geraldo Cuzzuol e Viviana Corte por terem me recebido com carinho em seus laboratórios;

As Professoras Andréia Gontijo e Viviana Corte, membros da banca examinadora, por todas as contribuições e acréscimos.

Aos amigos do Laboratório de Sementes e Ecofisiologia Florestal e do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, em especial ao Josinei, à Camila, à Tarsila e à "Tati-Xis". Também aos amigos dos outros laboratórios, em especial à Francielen, à Monique e à Mayara;

À Flora Tietê Associação de Recuperação Florestal (Penápolis-SP) pela doação das sementes de *Cedrela fissilis*;

À agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e bolsa de estudo;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal;

À Universidade Federal do Espírito Santo.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estágios de desenvolvimento da pesquisa. (A) germinação *in vitro*; (B) planta com 30 dias, ponto de extração dos explantes; (C) explantes extraídos (I: apical; II: nodal; III: cotiledonar); (D) multiplicação *in vitro*; (E) enraizamento *in vitro*; (F) aclimatização. Barras = 1 cm. .... 34
- Figura 2: Padrão morfológico das plantas de *C. fissilis* germinadas nos diferentes meios de cultivo. (A) MS, (B) MS ½ força, (C) B5, (D) B5 ½ força. Barras = 1 cm. .... 36
- Figura 3: Média do número (A) e do comprimento (B) dos brotos regenerados a partir de explantes apicais, nodais e cotiledonares de *C. fissilis* sob a influência das diferentes concentrações de citocininas após 30 dias de cultivo. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as diferentes concentrações, letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes tipos de explantes no mesmo tratamento de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade. .... 38
- Figura 4: Padrão morfológico dos brotos regenerados de *C. fissilis* a partir do explante apical (I), nodal (II) e cotiledonar (III) nas diferentes concentrações de citocinina [(A) 0 µM; (B) 0.5 µM; (C) 2 µM; (D) 4 µM], após 30 dias de cultivo. Barras = 1 cm. .... 42
- Figura 5: Porcentagem de enraizamento dos brotos regenerados (A) e média do número de raízes por explante (B) de *C. fissilis* submetidos aos tratamentos com ANA e AIB em diferentes concentrações (0; 1 e 3 µM) após 30 dias de cultivo *in vitro*. Colunas com letras iguais não diferem entre si de acordo com o teste Tukey a 5%. .... 43
- Figura 6: Padrão morfológico dos brotos enraizados de *C. fissilis* nas diferentes concentrações de reguladores de crescimento [(A) CONTROLE; (B) ANA 1 µM; (C) ANA 3 µM; (D) AIB 1 µM; (E) AIB 3 µM], após 30 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 1 cm. .... 45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios para porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), massa fresca total (MF), massa seca total (MS), número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) de *C. fissilis* após 30 dias de inoculação em diferentes meios de cultivo.

..... 35

## RESUMO

*Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae) é uma espécie de madeira valiosa da Mata Atlântica e que tem sido amplamente explorada o que a levou à ameaça de risco de extinção (categoria VU). A propagação *in vitro* de espécies florestais nativas apresenta-se como uma saída viável para a reversão ou mitigação desse quadro. Tendo em vista que poucos são os estudos disponíveis sobre cultura *in vitro* de *C. fissilis* que buscam associar o aumento da produtividade com a maximização do custo-benefício, este trabalho objetivou descrever um protocolo para propagação vegetativa de *C. fissilis*, utilizando a técnica de micropropagação. Para germinação *in vitro* testou-se o meio MS e B5, concentração total e meia força, optando-se, posteriormente, pelo MS ½ força, por apresentar melhores resultados de %G (82) e IVG (1.218). Para a micropropagação, os explantes foram cultivados para indução de brotos em meio de MS suplementado com citocininas, KIN ou BAP (0; 0.5; 2; 4 µM) isoladamente, e para a indução de raiz, utilizou-se meio de MS suplementado com auxinas, AIB ou ANA (0; 1; 3 µM) isoladamente. A indução de brotos foi significativamente afetada pela origem do explante e a concentração das citocininas utilizadas no processo. Os maiores valores para variável número de brotos (3.84) e comprimento dos brotos (2.2), foram alcançados em meio de MS sem suplementação de citocinina. O enraizamento foi alcançado em todos os tratamentos testados, com número de raiz por explante sendo numericamente superior (2.55) para aquele suplementado com 3 µM de AIB. As plantas regeneradas foram aclimatizadas em substrato comercial esterilizado, com taxa de sobrevivência *ex vitro* superior a 10% após 30 dias.

**Palavras-chave:** Cedro-rosa, Micropropagação, Regulador de crescimento, Segmento cotiledonar.



## ABSTRACT

*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) is a valuable wood species from the Atlantic Forest and have been widely explored that takes it to the risk of extinction (VU category). The *in vitro* propagation of native forestry species presents as a viable source to reverse and alleviate this situation. Due to the few studies available of *in vitro* culture of *C. fissilis* that associate the productivity rise with maximization of cost-benefit, this work aimed at describing a protocol for vegetative propagation of *C. fissilis* using micropropagation technique. For *in vitro* germination, it was tested the MS and B5 medium, the total concentration and half force, and half force MS medium was chosen later because of the better results of %G (82) and GSI (1.218). For micropropagation, the explants were cultivated for buds induction in MS medium supplemented with cytokinins KIN or BAP (0; 0.5; 2; 4  $\mu\text{M}$ ) isolatedly, and for roots induction it was used MS supplemented with auxins AIB or ANA (0; 1; 3  $\mu\text{M}$ ) isolatedly. The buds induction were significantly affected by the explant origin and the concentration of cytokinin used in the process. The highest scores for bud numbers (3.84) and bud length (2.2) were reached in MS without cytokinin supplementation. The rooting was reached in all treatments, with number of roots for explants being numerically higher (2.55) in the one supplemented with 3  $\mu\text{M}$  AIB. The regenerated plants were acclimatized in sterile commercial substrate, with *ex vitro* survival rate higher than 10% after 30 days.

**Keywords:** Pink cedar, Micropropagation, Growth regulator, Cotyledon segment.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. <i>Cedrela fissilis</i> Vell.	13
2.1.1. Biologia e Ecologia	13
2.1.2. Importância Econômica e Biotecnológica	14
2.2. Propagação <i>in vitro</i> de espécies florestais	16
2.3. Propagação de <i>Cedrela fissilis</i>	17
2.3.1. <i>Ex vitro</i>	17
2.3.2. <i>In vitro</i>	18
3. OBJETIVO GERAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. REFERÊNCIAS	21
ARTIGO	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
Germinação <i>in vitro</i> de <i>Cedrela fissilis</i> em diferentes meios de cultivo	31
Multiplicação <i>in vitro</i> de explantes de <i>C. fissilis</i> sob diferentes concentrações de citocininas	32
Enraizamento <i>in vitro</i> de <i>C. fissilis</i> sob diferentes concentrações de auxinas	32
Aclimatização	33
Análise estatística	33
Análise morfológica	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
Germinação <i>in vitro</i> de <i>Cedrela fissilis</i> em diferentes meios de cultivo	34
Multiplicação <i>in vitro</i> de explantes de <i>C. fissilis</i> sob concentrações diferentes de citocininas	38
Enraizamento <i>in vitro</i> de <i>C. fissilis</i> sob diferentes concentrações de auxinas	42
Aclimatização	45
CONCLUSÃO	47
AGRADECIMENTOS	48
REFERÊNCIAS	48

## 1. INTRODUÇÃO

A exploração indiscriminada das florestas nativas, como a Mata Atlântica, para obtenção de madeira e outros produtos não madeireiros, veem colaborando para que muitas espécies e, até mesmo populações sejam categorizadas em algum nível de risco de extinção (Oliveira et al., 2013; ICMBio, 2016; CNCFlora, 2019). A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) alertou em 2015, que o mundo segue perdendo cerca de 0,08% de sua cobertura florestal anualmente, mesmo com a redução significativa do desmatamento na última década.

*Cedrela fissilis* Vell. é um exemplo dessas espécies que vêm sofrendo com a exploração irresponsável das florestas naturais, encontrando-se, atualmente, categorizada com risco de extinção VULNERÁVEL (CNCFLORA, 2013; Barstow, 2018; Flores, 2019). Mesmo sendo uma espécie florestal de dispersão ampla em todo o Brasil (Stefano et al., 2015), com ocorrência registrada em importantes biomas brasileiros como Amazônia; Caatinga; Cerrado; Mata Atlântica (Caldas, 2006), sua classificação em uma das classes de risco de extinção confirmam a suspeita anteriormente levantada por Patiño-Valera (1997) de que a espécie, em toda sua área de ocorrência, poderia estar sofrendo uma severa erosão genética pela perda tanto de população como de indivíduos.

Por ser alvo do extrativismo e da exploração indiscriminada, devido à alta qualidade e o alto valor comercial da madeira, a espécie segue, mesmo nos dias atuais, sofrendo com derrubadas desproporcionais nas formações vegetais onde ocorre naturalmente (Ruiz Filho et al., 2004).

Considerando processos de extinção de muitas espécies das florestas tropicais, como *C. fissilis*, o Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF, 2002) cita como prioridades para a silvicultura o desenvolvimento de clones e plantas melhoradas para disponibilização no mercado.

A propagação de espécies florestais por meio de técnicas clássicas, que ocorre principalmente via semente, apresenta inúmeras dificuldades ao longo do processo. Dessa forma, a propagação vegetativa apresenta-se como alternativa de multiplicação no que se refere às dificuldades na propagação seminal de espécies florestais nativas, tanto ao considerar as finalidades comerciais quanto a conservação de recursos genéticos (Oliveira et al., 2013).

A cultura de tecidos vegetais é um método moderno de propagação e conservação de espécies de plantas. Além de seu uso como ferramenta de pesquisa, as técnicas de cultivo *in vitro* têm, nos últimos anos, ampliado sua importância para indústria na área de propagação de plantas, eliminação de doenças, melhoramento de plantas e produção de metabólitos secundários. (Nunes et al., 2003; Noieto e Silveira, 2004; Fick, 2007; Souza e Pereira, 2007; Fumagali et al., 2008; Pelegrini et al., 2011; Malosso et al., 2012; Oseni et al 2018).

Apesar do elevado número de pesquisas em relação a propagação *in vitro* de espécies florestais nativas esse número ainda é bem reduzido diante da diversidade da flora brasileira (Santos et al., 2011). Além disso, as respostas das plantas às técnicas de cultivo *in vitro* são variáveis, e dependem da espécie, variedade e/ou cultivar, época de coleta, tipo de explante utilizado e condições de cultivo. A variabilidade genética entre espécies e dentro da mesma espécie pressupõe o ajuste da metodologia para cada material genético, o que torna o processo demorado, e em certas ocasiões, oneroso (Wendling et al., 2006).

Estudos anteriores, Nunes et al. (2002) mostram possibilidades para o desenvolvimento de um protocolo de propagação *in vitro* viável para plantas de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.), entretanto a elucidação da melhor forma de fazê-lo e a eficácia das etapas não foram completamente esclarecidas.

Diante dessas questões, o presente trabalho teve como objetivo a proposição de um protocolo de micropropagação de *Cedrela fissilis* Vell., tendo em vista revisão bibliográfica previamente realizada, que sinaliza a carência de especificações no trato com a espécie. Nesse sentido, os próximos tópicos irão abarcar sobre as peculiaridades ecológica, econômica e biotecnológica do cedro-rosa enquanto espécie florestal, seguido do artigo como produto final da pesquisa.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Cedrela fissilis* Vell.

#### 2.1.1. Biologia e Ecologia

A família Meliaceae pertencente a ordem Sapindales compreende 550 espécies distribuídas em aproximadamente 50 gêneros. No Brasil, são encontradas 84 espécies distribuídas em 7 gêneros (Flores et al., 2017). Meliaceae é encontrada em todos os estados do Brasil, contudo, o maior número de espécies é concentrado principalmente nos domínios fitogeográficos da Amazônia e da Mata Atlântica (The Brazil Flora Group, 2015).

O gênero *Cedrela* descrito pela primeira vez por Browne em 1756 engloba 3 espécies, nenhuma endêmica do Brasil (Forzza et al., 2010). Os cedros como são conhecidas as árvores desse gênero merecem destaque por produzem madeira de boa qualidade para a indústria madeireira e moveleira.

*Cedrela fissilis* conhecido popularmente com cedro, cedro-rosa ou acaiacá, exibe porte arbóreo, alcançando de 8 a 35 m de altura, com tronco 60 a 90 cm de DAP (diâmetro a altura do peito). É uma espécie com capacidade de adaptação a diferentes condições de luz (Santos et al., 2006), podendo ser considerada heliófita ou esciófita e apresenta crescimento rápido, sobretudo em solos profundos e úmidos, quando recebe bastante luz (Reitz et al., 1979; Carvalho, 1994; Lorenzi, 2008).

Essa espécie possui folhas compostas e alternas, medindo entre 25 a 60 cm, com 8 a 30 pares de folíolos. As flores são pequenas e hermafroditas, brancas com tons levemente esverdeados e ápice rosado. Os frutos são cápsulas em forma de pêra, deiscentes, lenhosas com coloração marrom e lenticelas claras e alojam de 30 a 100 sementes. O período de maturação é longo, cerca de 10 meses, os frutos tendem a permanecer verdes nas árvores até o próximo período seco, para então maturarem e terem as sementes dispersadas (Santos e Takaki, 2005). Essas são elipsóides e aladas, a cor varia do bege ao castanho avermelhado com ampla variação de dimensão, apresentando até 35 mm de comprimento por 15 mm de largura. Os frutos, assim como as sementes, são dispersos por anemocoria (Lorenzi, 2008; Flores et al., 2017).

A floração e a frutificação se iniciam entre 10 a 15 anos após o plantio, florescendo em épocas distintas ao longo do território nacional que variam entre

agosto a março, e frutificando geralmente dois meses depois (Carvalho, 1994). Entretanto, a floração ocorre de forma irregular, não acometendo todas as árvores em todos os anos (Ferraz et al., 1999; Santos e Takaki, 2005). Os frutos são colhidos cerca de 2 a 3 semanas antes da deiscência natural. Esse ponto ideal é indicado pela coloração dos frutos, que mudam do verde para marrom claro. As sementes de cedro-rosa são ortodoxas, armazenadas a frio e conservam seu poder germinativo por até 240 dias (Figliolia, 1988; Corvello et al., 1999).

*C. fissilis* é uma espécie florestal de dispersão ampla em todo o Brasil (Stefano et al., 2015), encontrada na Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Mista (Amazônia e Mata Atlântica), na Floresta Estacional Semidecidual (Floresta de Araucárias) e na Floresta Estacional Decidual, além da Caatinga e Cerrado (Klein, 1984; Carvalho, 1994; Caldas, 2006). De acordo com Rizzini e Mors (1976), a espécie é encontrada desde o Pará até a Argentina.

No processo de sucessão, *C. fissilis* é considerada uma espécie secundária inicial e/ou secundária tardia, sendo encontrada em capoeirões, matas secundárias ou semidevastadas, podendo também se desenvolver no interior da floresta primária e além de ser encontrada como espécie pioneira na vegetação secundária, regenerando-se preferencialmente em clareiras ou bordas de mata (Reitz et al., 1979; Carvalho, 1994; Lorenzi, 2008). A agressividade da espécie é evidenciada ainda por Reitz et al. (1979) onde afirmam que *C. fissilis* tem grande adaptação e agressividade sobre agrupamentos menos desenvolvidos e também na vegetação secundária.

### **2.1.2. Importância Econômica e Biotecnológica**

A flora brasileira é repleta de espécies arbóreas com grande valor e importância econômica com alto potencial de exploração, seja pela madeira ou por compostos extraídos da planta. Além de apresentarem um importante potencial de utilização em programas de reflorestamento de áreas degradadas, de áreas de preservação permanente e também pelo potencial ornamental em projetos paisagísticos de parques e grandes jardins (Klein, 1984; Lorenzi, 2008).

Famílias como a Meliaceae, em que se destacam os gêneros *Cedrela*, *Trichilia* e *Swietenia*, são responsáveis por grande parte da madeira utilizada no mundo. A madeira de *Cedrela fissilis* apresenta alburno variando do branco a rosado e cerne variando do bege-rosado-escuro ou castanho-claro-rosado mais ou menos intenso até o castanho avermelhado. Apresenta boa retenção de pregos e parafusos; excelente

absorção de pigmentos e polimento. Entre as madeiras leves, o cedro é a que possibilita o uso mais diversificado possível, superado somente pela madeira da espécie *Araucaria angustifolia* (Pinheiro-do-Paraná) (Carvalho, 1994; Lorenzi, 2008).

Com altíssimo valor econômico e comercial *C. fissilis* tem sua madeira largamente utilizada em carpintaria, marcenaria, esquadrias, forros e compensados, construção naval e aeronáutica, móveis em geral, caixas de charutos, lápis e instrumentos musicais, modelos e molduras. É também comumente usada na arborização em áreas urbanas, como parques e praças, assim como em composições de recuperação de áreas degradadas e reposição de matas ciliares, entretanto, sempre em locais com ausência de inundação e em plantios heterogêneos (Rizzini e Mors, 1976; Lorenzi, 2008).

O potencial biotecnológico da família pode ser útil a espécie de *C. fissilis* na busca por genótipos mais resistentes ao ataque de *Hypsipyla grandella* (broca do cedro), considerado como o maior problema dos cultivos homogêneos da espécie, sejam eles em plantio de larga escala, ou em menores proporções como na regeneração natural. O ataque as gemas laterais, promovido pela broca do cedro, leva ao desenvolvimento arbustiforme e em casos mais extremos a morte da planta (Carvalho, 1994).

Estudos com plantas de *Cedrela odorata* enxertadas em *Toona ciliata*, quando introduzidas no Brasil mostraram excelente crescimento e ausência do ataque por *H. grandella*, pela translocação de sesquiterpenos, triterpenóides, limonóides e flavonóides, em *Cedrela*, essa pode ser uma ação de resistência contra o ataque desta praga (Paula et al., 1997).

Devido à presença de compostos como os citados acima, a família Meliaceae possui inúmeras espécies com destaque na medicina popular, com propriedades terapêuticas reconhecidas como: ação anti-viral, anti-helmíntica, anti-reumática, anti-inflamatória e anti-cancerígena (Pupo et al., 1994; Souza e Silva, 1994; Benencia et al., 1995; Marzalina e Krishnapillay, 1999).

Os estudos realizados por Goulart et al. (2004) encontraram terpenos farnesol, nerolidol, limoneno, e linalol em extratos de *C. fissilis*, que possuem atividade antimalárica em alguns estágios do *Plasmodium falciparum*. Óleos essenciais obtidos a partir das folhas de *C. fissilis* segundo Lagos et al. (2004) apresentam atividade antibacteriana capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Ambrozini et al. (2006) estudando extratos de folhas e raízes de *C. fissilis* isolaram

limonóides com ação inseticida sobre a formiga *Atta sexdens rubropilosa*. Também analisando extratos de folhas e raízes, Ramos et al. (2008) observaram a atividade anti-micobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium kansasii*.

A família Meliaceae é conhecida pela grande produção de limonóides, principal composto da classe dos terpenos. Esses compostos são toxinas e inibidores do forrageio para muitos insetos e mamíferos herbívoros. Assim, o uso de técnicas da biotecnologia e da cultura de tecidos podem ser alternativas importantes e viáveis para a síntese de tais compostos, que tem atraído considerável interesse por causa de suas propriedades biológicas, atividade inseticida e diversidade de estruturas (Viegas Jr., 2003; Roy e Saraf, 2006; Leite et al., 2009; Taiz e Zeiger, 2013).

## **2.2. Propagação *in vitro* de espécies florestais**

As técnicas de propagação *in vitro* tornaram-se componentes integrantes de programas de melhoramento e conservação de espécies arbóreas (Pence, 2010; Sarasan, 2010), principalmente as de aplicações comerciais. Muitas dessas espécies estão sendo categorizadas como ameaçadas ou em perigo (IUCN 2019) por causa das derrubadas por madeira, conversão para terras agrícolas, estratégias de manejo ineficientes e taxas gerais de desmatamento que não conseguem acompanhar a regeneração natural das florestas nativas.

As vantagens de usar a propagação *in vitro* para melhorar o plantio de espécies de árvores florestais já são discutidas há várias décadas. Diferentes técnicas de cultura de tecidos são hoje utilizadas visando solucionar problemas em diferentes segmentos da área agrícola e florestal (Giri et al., 2004). Em programas de melhoramento, a propagação vegetal *in vitro*, principalmente a técnica de micropropagação, tem destaque especial porque permite a propagação de um grande número de plantas livres de patógenos em um curto espaço de tempo (Kumar e Reddy, 2011; Pijut et al., 2012).

Além disso, a micropropagação pode ser economicamente mais lucrativa do que a propagação convencional. Isso depende principalmente da escala de produção e também da capacidade das plantas de serem micropropagadas usando protocolos simples (Monteuuies, 2016). Vários fatores influenciam no comportamento da cultura *in vitro* e, por consequência, no sucesso do mesmo; fatores biológicos (tipo e condição



fisiológica do explante, características genéticas, outros), químicos (composição do meio de cultura, reguladores de crescimento e suas concentrações, outros) e físicos como temperatura, luminosidade, fotoperíodo, entre outros, por isso a importância de estabelecimento de protocolos viáveis (Grattapaglia e Machado, 1998).

Outras estratégias de cultivo *in vitro* também podem ser empregadas nos estudos para espécies ameaçadas, tal como a embriogênese somática - a partir da utilização de embriões zigóticos maduros ou imaturos ou ainda através da cultura de calos. Entretanto, a micropropagação pela proliferação de gemas axilares, corresponde ao método mais utilizado na propagação *in vitro* de várias espécies lenhosas (Oliveira et al., 2013).

### **2.3. Propagação de *Cedrela fissilis***

#### **2.3.1. *Ex vitro***

Os aspectos limitantes da produção *ex vitro* ou silvicultural de espécies nativas, começam na quantidade e qualidade das mudas, assim como a variedade disponível, e se estendem as técnicas de plantio (Tzfira et al., 1998; Debnath, 2004; Ferrari et al., 2004). Assim o conhecimento e a compreensão sobre a fenologia da espécie florestais nativas podem contribuir para facilitar os processos de cultivo (Viani e Rodrigues, 2007).

Em se tratando de *C. fissilis* a indicação para cultura *ex vitro* são os plantios mistos para diferentes regiões do país (Andrade, 1957; Inoue, 1977; Carvalho, 1994; Carvalho, 2003). Povoamentos homogêneos, a pleno sol, são desaconselhados devido à acentuada vulnerabilidade ao ataque de *Hypsipyla grandella* Zeller, a broca das meliáceas, que danifica a gema apical e a formação do fuste (Carvalho, 1994).

*C. fissilis* exibe germinação epígea, com início entre cinco a 75 dias após a sementeira, apresentando poder germinativo bastante variável, entre 35% a 95%, em média 60% (Carvalho, 2003). Figliolia et al. (2006) testaram a influência de diferentes temperaturas, quantidades de luz e umidade do substrato na germinação de sementes da espécie, não verificando grandes mudanças com a variação dessas características. Os autores ainda observaram porcentagens de germinação entre 81% a 90% e índice de velocidade de germinação entre 1,27 a 1,48.

Cherobini et al. (2008) trabalhando com lotes de sementes de *C. fissilis* dos municípios de Santa Cruz do Sul-RS, Rio do Sul-SC, e Iratí-PR,

encontraram variações entre os lotes de sementes nas variáveis índice de velocidade de germinação (1,7, 1,2 e 0,5) e porcentagem de emergência (71%, 62% e 33%) aos 30 dias.

Recomenda-se a remoção da porção alada das sementes antes da germinação. A semeadura pode ser feita em sementeira, por semeadura direta, com uma semente por tubete, evitando perda de produção. Cedro-rosa propaga-se com relativa facilidade, via estacas radiculares, rebento de raízes ou sementes. Cerca de quatro meses após a semeadura, as mudas já estão aptas para o plantio (Carvalho, 2003).

### **2.3.2. *In vitro***

A propagação *in vitro* pode ser adotada como uma alternativa econômica viável em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais nativas, pois além de realizar a propagação de árvores selecionadas, possibilita a limpeza clonal, para obtenção de plantas livres de vírus por meio de ápices caulinares e meristemas, superando problemas de contaminação (Wendling et al., 2006). Além de exibir uma alta taxa de multiplicação, fato este que possibilita a propagação vegetativa de genótipos de alto valor comercial (Teixeira et al., 2005).

Pesquisas com *C. fissilis* foram desenvolvidas utilizando-se de variadas técnicas de propagação *in vitro*. A pesquisa de Nunes et al. (2002) com o uso da técnica de micropropagação a partir de segmentos cotiledonares, aponta um efeito significativo do explante e da concentração de citocinina sobre a multiplicação dos brotos, além de indicar que a aplicação de ácido indol-3-butírico (AIB) 2,5  $\mu\text{M}$  no meio de cultivo obteve melhor resposta na fase de enraizamento.

Em estudo posterior, Nunes et al. (2003) sinalizam que a espécie pode ser conservada por até 2 meses, através de seus propágulos encapsulados em alginato com quase 100% de viabilidade ou pela imersão das sementes em nitrogênio líquido.

Embriões somáticos foram obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos do *C. fissilis*, após um período de cultura de 12 meses, com subculturas regulares a cada 6-8 semanas. Estudos histológicos posteriores mostraram que os embriões somáticos em estágios avançados apresentavam raízes e meristemas apicais, além de conterem sistema vascular e características típicas de um embrião somático (Vila et al., 2009).

Entretanto, apesar dos diversos estudos em relação a micropropagação de espécies florestais nativas, especialmente no caso de *C. fissilis*, esse quantitativo é

incipiente, tendo em vista o volume de espécies florestais arbóreas no Brasil - cerca de 7.880, segundo dados do Serviço Florestal Brasileiro (2019).

No que tange a opção pela propagação *in vitro* de *C. fissilis* e suas vantagens comparativas à produção *ex vitro*, ressalta-se seu potencial na maior produção de mudas. O número potencial de plantas obtidas por propagação pelas técnicas tradicionais é semelhante ao número de sementes semeadas (Carvalho, 2003), enquanto que a cultura de tecidos possibilita um quantitativo de mudas superior, pois a utilização de segmentos para multiplicação, possibilita a formação de mais de uma planta por semente (Akin-Idowu et al., 2009). Além do exposto, a cultura de tecidos vegetal pode viabilizar o melhoramento genético visando obter genótipos superiores e mais resistentes (Chaves, 2001).

### 3. OBJETIVO GERAL

Descrever um protocolo para propagação vegetativa de *Cedrela fissilis* Vell., a partir de plântulas *in vitro* proveniente de sementes como fonte dos explantes, utilizando a técnica de micropropagação e viabilizando futuras pesquisas biotecnológicas para essa espécie.

### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer, inicialmente, as plântulas de cedro-rosa, a partir da germinação de sementes *in vitro* testando diferentes meios de cultivo (MS, MS ½, B5 e B5 ½);
- Induzir brotos via organogênese direta, a partir de diferentes explantes (segmento apical, nodal e cotiledonar) provenientes de plântulas estabelecidas *in vitro*, testando tipos e concentrações de citocininas (KIN e BAP);
- Induzir o surgimento de raízes adventícias com auxinas (AIB e ANA) em diferentes concentrações;
- Aclimatizar as plantas regeneradas avaliando a taxa de sobrevivência.

## 5. REFERÊNCIAS

- Akin-Idowu, P.E., Ibitoye, D.O., Ademoyegun, O.T. (2009). Tissue culture as plant production technique for plant horticultural crop. **African Journal of Biotechnonlogy**, 8(16): 3782-3788.
- Ambrozin, A.R.P.; Leite, A.C.; Bueno, F.C. (2006) Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 3.n. 17. p. 542 – 547.
- Andrade, D. X. (1957) Considerações sobre a cultura do cedro. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, Rio de Janeiro, v.9, n.9, p.122-130.
- Barstow, M. (2018) *Cedrela fissilis*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2018**. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T33928A68080477>. Acessado em 16/01/2019.
- Benecia, F.; Courrégés, M.C.; Nores, M.M.; Coulombié, F.C. (1995) Immunomodulatory activie of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, n.49. p. 133-139.
- Caldas, L.S. (2006) Pomares de sementes de espécies nativas as funções das redes de sementes. In: Higa, A. R.; Silva, L.D. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF do Paraná, p. 227-241.
- Carvalho, P. E. R. (2003) **Espécies Arbóreas Brasileiras**, Colombo: Embrapa Florestas.
- Carvalho, P.E.R. (1994) **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo, PR. EMBRAPA – CNPF/SPI. 639 p.
- Chaves, L. J. (2001) Interação de genótipos com ambientes. In.: NASS, L. L et al. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento** - Planta. Rondonópolis: Fundação MT, p. 673-713.
- Cherobini, E. A. I.; Muniz, M. F. B.; Blume, E. (2008) Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n.1, p. 65-73.
- CNCFlora - Centro Nacional De Conservação Da Flora (2019) Disponível em <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal>> Acessado em 04/01/2019.
- CNCFlora - Centro Nacional De Conservação Da Flora. (2013) **Livro vermelho da flora do Brasil**. Martinelli, G., Moraes, M. A. (orgs). 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 1100 p.

- Corvello, W. B. V.; Villela, F. A.; Nedel, J. L.; Peske, S. T. (1999) Maturação fisiológica de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.2, p.23-27.
- Debnath, S.C. (2004) Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. **Plant Growth Regulation**. Boston, n. 4, v. 3, p. 179-186.
- FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations (2015) **World deforestation slows down as more forests are better managed**. <http://www.fao.org/news/story/en/item/326911/icode/>. Acessado em: 18/01/2019.
- Ferrari, M.P.; Grossi, F.; Wendling, I. (2004) **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Floresta, 22 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 94).
- Ferraz, D.K.; Artes, R.; Mantovani, W.; Magalhães, L.M. (1999) Fenologia de árvores em fragmento de mata em São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Biologia**. Rio de Janeiro. v. 59, n. 2, p. 305-317.
- Fick, T. A.; Bisognin, D. A.; Quadros, K. M.; Horbach, M.; Reiniger, L. R. (2007) Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo (*Cordia trichotoma*). **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 17, n. 4, p. 343-349.
- Figliolia, M. B.; Aguiar, I. B. De; Silva, A. Da. (2006) Germinação de sementes de *Lafoensia glyptocarpa* Koehne (mirindiba-rosa), *Myroxylon peruiferum* L.f. (cabreúvavermelha) e *Cedrela fissilis* Vell. (cedro-rosa). *Revista do Instituto Florestal*, São Paulo, v. 18, n. único, p. 49-58.
- Figliolia, M.B. (1988) Conservação de sementes de essências florestais. **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, São Paulo. v.42, p.1-18.
- Flores T.B., Souza V.C.; Coelho R.L.G. (2017) Flora do Espírito Santo: Meliaceae. **Rodriguésia** v. 68, n. 5, p. 1693-1723.
- Flores, T.B. (2019) *Meliaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB9990>. Acessado em 16/01/2019.
- Forzza, R. C., org., et al. (2010) Instituto De Pesquisas Jardim Botânico Do Rio De Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v. 2. 828 p.

- Fumagali, E.; Gonçalves, R.A.C.; Machado, M.F.P.S.; Vidoti, G.J.; Oliveira, A.J.B. (2008) Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641.
- Giri, C.C.; Shyamkumar, B.; Anjaneyulu, C. (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v.18, n.2, p.115-135.
- Goulart, H.R.; Kimura, E.A.; Peres, V.J.; Couto, A.S.; Aquino Duarte, F.A.; Katzin, A.M. (2004) Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7 p. 2502 – 2509.
- Grattapaglia, D.; Machado, M.A. (1998) Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, v.1, p. 183-260.
- ICMBio - Instituto Chico Mendes De Conservação Da Biodiversidade. (2016) **Sumário Executivo do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília/DF.
- Inoue, M. T. (1977) A auto-ecologia do gênero *Cedrela*: efeitos na fisiologia do crescimento no estágio juvenil em função da intensidade luminosa. *Revista Floresta*, Curitiba, v.8, n.2, p.58-61.
- IPEF. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. (2002) **Ciência e tecnologia no setor florestal brasileiro**: diagnóstico, prioridades e modelo de financiamento – Relatório Final. Piracicaba: Ministério da Ciência e Tecnologia, 12p.
- IUCN - União Internacional Para Conservação Da Natureza (2019) **The IUCN Red List of Threatened Species**. <https://www.iucnredlist.org/>. Acessado em 10/01/2019.
- Klein, R.M. (1984) **Flora Ilustrada Catatinense – Meliáceas**. Itajaí, SC. 140 p.
- Kumar, N. e Reddy, M. (2011). In vitro Plant Propagation: A Review. **Journal of Forest and Environmental Science**. V. 27, n. 2, p. 61-72.
- Lago, J.H.G.; Ávila, P.; Aquino, E.M.; Moreno, P.R.H.; Ohara, M.T.; Nimberger, R.T.; Apel, M.A.; Henriques, A.T. (2004) Volatile oils from leaves and stem barks of *Cedrela fissilis* (Meliaceae): chemical composition and antibacterial activities. **Flavour and Fragrance Journal**, n. 19. p. 1 – 4.

- Leite, A.C.; Ambrozini, A.R.P.; Castilho, M.S.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B.; Oliva, G.; Silva, M.F.G.F.; Thiemann, O.H.; Lima, M.I.; Pirani, J.R. (2009) Screening of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enzyme inhibitors. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19 (1A) p. 1 – 6.
- Lorenzi, H. (2008) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5.ed. **Nova Odessa**: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, v. 1. 384 p.
- Malosso, M.G.; Bertoni, B.W.; Coppede, J.S.; França, S.C.; Pereira, A.M.S. (2012) Micropropagation and *in vitro* conservation of *Jacaranda decurrens* Cham. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 6, n. 7, p. 1147-1154.
- Marzalina, M.; Krishnapillay, B. (1999) Recalcitrant seed Biotechnology applications to rain forest conservation. In: Benson, E.E. (Ed.). **Plant Conservation Biotechnology**, London: Taylor and Francis Ltd., p. 265-276.
- Monteuuis, O. (2016) Micropropagation and production of forest trees. **Vegetative Propagation of forest tree**. National Institute of Forest Science. p. 32-55.
- Noletto, L.G.; Silveira, C.E.S. (2004) Micropropagação de Copaíba. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 33, p. 109-120.
- Nunes, E. C.; Castilho, C. V.; Moreno, F. N.; Viana, A. M. (2002) *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, n. 3, p. 259-268.
- Nunes, E.C.; Benson, E.E.; Oltramari, A.C.; Araujo, P.S.; Juliana Righetto Moser, J.R.; Viana, A. M. (2003) *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**. v. 12, p.837–848.
- Oliveira, L.S.; Dias, P.C. E Brondani, G.E. (2013) Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453.
- Oseni, O. M.; Pande, V.; Nailwal, T. K. (2018)** A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci** 7(7): 3778-3786.
- Patiño-Valera, F. (1997) **Genetic resources os *Swietenia* and *Cedrela* in the neotropics**. Rome: United Nations Food and Agriculture Organization. 58 p.
- Paula, J.R.; Vieira, I.J.C.; Silva, M.F.G.F.; Fo, E.R.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C.; Pinheiro, A.L.; Vilela, E.F. (1997) Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and



- flavonoids of *Cedrela odorata* graft and speculations on the induced resistance against *Hypsipyla grandella*. **Phytochemistry**, v. 44 n.8. p. 1449 - 1454.
- Pelegrini, L.L.; Ribas, L.L.F.; Zanette, F.; Koehler, H.S. (2011) Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 9, p. 1527- 1523.
- Pence, V. C. (2010) The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. **Kew Bulletin**, 65: 539-547.
- Pijut, P.M.; Beasley, R.R.; Lawson, S.S.; Palla, K.J.; Stevens, M.E., Wang, Y. (2012) *In vitro* propagation of tropical hardwood trees species – A review (2001-2011). **Propagation of ornamental plants**. V.12, n1, p. 25-51.
- Pupo, M.T., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Silva, M.F.G.F. (1994) Potenciais antitumorais de *Trichilia clausenii*. In: XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Fortaleza – CE.
- Ramos, D.F.; Leitão, G.G.; Costa, F.N.; Abreu, L.; Villarreal, J.V.; Leitão, S. G.; Fernández, S.L.S.; Da Silva, P.E.A. (2008) Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 44. n. 4. p. 669 – 674.
- Reitz, R; Klein, R.M.; Reis, A. (1979) **Madeiras do Brasil**. Florianópolis, SC. Ed. Lunardelli.
- Rizzini, C.T.; Mors, W.B. (1976) **Botânica Econômica Brasileira**. São Paulo: Ed. EPU. 207 p.
- Roy, A.; Saraf, S. (2006) Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 2. n. 29. p. 191 – 201.
- Ruiz Filho, R.R.; Santos A.F.; Medeiros, A.C.S.; Jaccoud Filho, D.S. (2004) Fungos associados às sementes de cedro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 494-496.
- Stefano, M. V.; Calazans, L. S. B.; Sakuragui, C. M. (2015) Meliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB009990>>. Acessado em 19/08/2017.
- Santos, D. L.; Takaki, M. (2005) Fenologia de *Cedrela fissilis* Vell (Meliaceae) na região rural de Itirapina. **Acta Botânica Brasília**. Porto Alegre. v. 1, n.3, p. 625-632.

- Santos, D.L.; Rakocevic, M. Takaki, M; Ribaski, J. (2006) Morphological and physiological responses of *Cedrela fissilis* Veloso (Meliaceae) seedlings to light. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. Curitiba. v. 49, n. 1, p. 171-182.
- Santos, J. P.; Davide A. C.; Teixeira, L. A. F.; Melo, A. J. S.; Melo, L. A. (2011) Enraizamento de estacas lenhosas de espécies florestais. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 293-301.
- Sarasan V. (2010) Importance of *in vitro* technology to future conservation programmes worldwide. **Kew Bulletin**, 65: 549-554.
- Serviço Florestal Brasileiro (2019) **Sistema Nacional de Informações Florestais: espécies florestais**. <<http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/especies-florestais>>. Acesso em: 18/01/2019.
- Souza, A.V.; Pereira, A.M.S. (2007) Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117.
- Souza, L.A.; Silva, I. (1994) Frutos e plântulas de espécies nativas de interesse medicinal. In: XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Fortaleza – CE.
- Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª Ed. Artmed. Porto Alegre, 2013.
- Teixeira, D.A.; Alfenas, A.C.; Mafia, R.G.; Maffia, L.A.; Ferreira, E.M. (2005) Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira** 30:350-356.
- The Brazil Flora Group (2015) Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia** 66: 1085-1113.
- Tzfira, T.; Amir Zuker, A; Altman, A. (1998) Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.439-446.
- Viani, R.A.G.; Rodrigues, R.R. (2007) Sobrevivência em viveiro de mudas de espécies nativas retiradas da regeneração natural de remanescente florestal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 8, p. 1067-1075.
- Viegas Jr., C. (2003) Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390 - 400.
- Vila, S.; Gonzalez, A.; Rey, H.; Mroginski, L. (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cedrela fissilis*. **Biologia Plantarum**. v. 53, n. 2, p. 383-386.

Wendling, I.; Dutra, L.F.; Grossi, F. (2006) **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas. 54 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).

Este artigo será submetido à **Revista Plant Cell Culture & Micropropagation (ISSN: 1808-9909)** e segue apresentado segundo as normas.

## ARTIGO

### PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Cedrela fissilis* VELL.

### UMA ESPÉCIE ARBÓREA BRASILEIRA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO

Yasmim Smarsaro<sup>1</sup>, Elias Terra Werner<sup>2</sup>

## RESUMO

*Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae) é uma espécie de madeira valiosa da Mata Atlântica e encontra-se ameaçada de risco de extinção (categoria VU). Dessa forma, buscando reverter o quadro de risco e associar o aumento da produtividade com a maximização do custo-benefício, desenvolveu-se um protocolo de propagação *in vitro* fazendo uso da técnica de micropropagação para a espécie *Cedrela fissilis*. Na germinação *in vitro* testou-se o meio MS e B5, concentração total e meia força, optando-se, posteriormente, pelo MS ½ força, tendo em vista os resultados de %G (82) e IVG (1.218). Na micropropagação, os explantes foram cultivados para indução de brotos em meio MS suplementado com KIN e BAP (0; 0.5; 2; 4 µM) separadamente, e para o enraizamento, utilizou-se meio de MS suplementado com auxinas, AIB e ANA (0; 1; 3 µM) separadamente. A indução de brotos foi significativamente afetada pelo tipo de explante e a pela concentração das citocininas. Os maiores valores para as variáveis número de brotos (3.84) e comprimento dos brotos (2.2), foram alcançados em meio de MS sem citocinina. Ocorreu enraizamento em todos os tratamentos testados, com número de raiz

---

<sup>1</sup> MS; Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Vitória, ES, Brasil. E-mail: y.smarsaro@hotmail.com

<sup>2</sup> Dr; Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Vitória, ES, Brasil. E-mail: elias.werner@ufes.br

por explante sendo numericamente superior (2.55) para aquele suplementado com AIB 3  $\mu$ M. As plantas regeneradas foram aclimatizadas com taxa de sobrevivência *ex vitro* superior a 10% após 30 dias. Este protocolo recomenda germinação em meio MS ½ força, com indução de brotos utilizando segmento cotiledonar, sem adição de citocinina, bem como a aplicação de AIB 3  $\mu$ M para o enraizamento.

**Palavras-chave:** Cedro-rosa, micropropagação, regulador de crescimento, segmento cotiledonar.

## INTRODUÇÃO

*Cedrella fissilis* Velloso (Meliaceae) conhecida popularmente como cedro, cedro-rosa ou acaiacá (Lorenzi, 2008) é uma espécie florestal de dispersão ampla em todo o Brasil (Stefano et al., 2015). Exibe uma madeira leve e de coloração característica e por isso apresenta altíssimo valor econômico e uso comercial abrangente (Carvalho, 1994; Rizzini e Mors, 1976). Em decorrência disso, é alvo do extrativismo e da exploração indiscriminada, mesmo nos dias atuais, acarretando em derrubadas desproporcionais (Ruiz Filho et al., 2004) e risco de extinção. Pelos motivos já expostos, *C. fissilis* encontra-se atualmente categorizada com risco de extinção VULNERÁVEL (CNCFlora, 2013; Barstow, 2018; Flores, 2019).

As necessidades mundiais frente à excessiva demanda por produtos oriundos de espécies vegetais nativas, colocam as técnicas biotecnológicas como linha de frente para obtenção de ganhos em produtividade e sustentabilidade (Watanabe e Raman, 1997).

Técnicas de propagação *in vitro* vêm sendo desenvolvidas para um grande número de espécies arbóreas florestais - um progresso sem precedentes na Biotecnologia Vegetal durante as últimas décadas (El-Lakanny, 1992; Haines, 1994; Kumar e Reddy, 2011; Pijuj et al., 2012; Oseni et al. 2018).

A micropropagação é uma técnica de propagação *in vitro* amplamente estudada, sendo a modalidade de cultura de tecidos, a mais difundida e com aplicações práticas comprovadas (Erig e Schuch, 2005).

Werner et al. (2007; 2009) realizaram estudos com *Paubrasilia echinata*, induzindo a calogênese em foliólulos para micropropagação da espécie. Utilizando-se de embriões zigóticos Silva et al. (2001) e Mortiz et al. (2009) trabalharam a técnica com *Ocotea odorífera* (Lauraceae), categorizada como EM PERIGO pela lista brasileira do REFLORA (Quinet et al., 2015). Outra espécie florestal arbórea estudada com a técnica de micropropagação é o jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*), alvo de estudos de Sartor et al. (2013) que fizeram uso de segmentos apicais e nodais almejando um protocolo adequado.

Portanto, a técnica de micropropagação exhibe inúmeras vantagens em relação à propagação vegetativa convencional. A propagação massal, por exemplo, permite a multiplicação em larga escala, a partir de genótipos selecionados, em espaço físico e tempo reduzidos, além de assegurar um material livre de patógenos e com alta uniformidade (Kumar e Reddy, 2011; Pijut et al., 2012).

Diante disso, estudos sobre a propagação *in vitro* de *C. fissilis*, além de oferecerem a possibilidade de produção de mudas em larga escala de forma homogênea para plantios comerciais, apresentam-se como uma opção eficaz para a aplicação de abordagens biotecnológicas de conservação e preservação da espécie.

Isto posto, propõe-se um protocolo de propagação *in vitro* de *C. fissilis* utilizando a técnica de micropropagação. As etapas para implantação desse, foram conduzidas buscando o aumento de produtividade, geração de mudas saudáveis e o melhor custo-benefício, considerando melhor meio de cultivo para o estabelecimento *in vitro*, assim como o segmento, os reguladores de crescimento e as concentrações para multiplicação e enraizamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Germinação *in vitro* de *Cedrela fissilis* em diferentes meios de cultivo

Sementes de *C. fissilis* Vell. foram adquiridas junto à Flora Tietê Associação de Recuperação Florestal (Penápolis-SP), safra de 2017 e lote CFI001SN. As sementes tiveram inicialmente as alas removidas e em seguida foram lavadas em água corrente com detergente neutro.

Em condições assépticas na câmara de fluxo laminar foram desinfestadas por imersão em álcool 70% com três gotas Twenn 20 por 1 minuto (min), seguido de hipoclorito de sódio comercial (cloro ativo 2,5%) e 5 gotas Twenn 20 por 75 min em agitação constante e, ao final, lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada (adaptado - Nunes et al., 2002).

Após a desinfestação as sementes foram inoculadas nos diferentes meios de cultivo: MS basal (MS, Sigma Co., EUA) (Murashige e Skoog, 1962) e B5 (B5, Sigma Co., EUA) (Gamborg et al., 1968) suplementados com 30g/L de sacarose (Sigma Co., EUA), e MS ½ e B5 ½ suplementados com 15g/L de sacarose. Todos os meios foram gelificados com 7,5g/L de ágar (Sigma Co., EUA), tendo o pH aferido para 5,8 e autoclavados a 121°C e pressão de 1,1 atm por 20 min.

As condições de cultivo da sala de crescimento foram ajustadas para temperatura de 25±1 °C, e luz branca constante do tipo luz do dia (fluorescentes), com 25,2 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de fluxos de fótons fotossintéticos. As avaliações ocorreram ao longo de 30 dias para mensuração das variáveis: porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG). E aos 30 dias de cultivo foram determinadas as variáveis: massa fresca e seca, comprimento da raiz e da parte aérea e número de folhas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições, sendo a repetição uma parcela constituída por dez tubos de ensaio (25 x 150 mm) com 10 mL de meio e uma semente.

### **Multiplicação *in vitro* de explantes de *C. fissilis* sob diferentes concentrações de citocininas**

Os testes de indução de brotos foram realizados a partir da excisão dos explantes de plantas previamente estabelecidas *in vitro*.

Conduziu-se o experimento em esquema fatorial 3x2x4, tendo no fator explante três níveis (segmentos apical, nodal e cotiledonar), no fator citocinina dois níveis [cinetina (KIN) e 6-benzilaminopurina (BAP)] (Sigma Co., EUA) e no fator concentração quatro níveis (0; 0,5; 2 e 4 $\mu$ M), em DIC, com 3 repetições, sendo a repetição constituída por 4 tubos por parcela, cada tubo com 1 explantes e 10 mL de meio MS.

As condições da sala de crescimento mantiveram-se as mesmas descritas anteriormente. Após 30 dias de cultivo foram mensuradas as variáveis número de brotos por explante, comprimento dos brotos e porcentagem raiz por explante.

### **Enraizamento *in vitro* de *C. fissilis* sob diferentes concentrações de auxinas**

Nesta etapa foram utilizados brotos que apresentaram as médias estatisticamente superiores para as variáveis número de brotos e comprimento por explante. Os brotos foram enraizados no mesmo meio da etapa anterior e nas condições da sala de crescimento já descritas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo testadas duas auxinas [ácido indol-3-butírico (AIB) e ácido naftalenacético (ANA)] (Sigma Co., EUA) em três concentrações (0; 1; 3 $\mu$ M), com 3 repetições por tratamento, sendo a repetição constituída por 10 tubos por parcela, cada tubo com 1 explante e 10mL de meio.

Após 30 dias de cultivo foram mensuradas as variáveis número de raiz por explante, porcentagem de enraizamento e de sobrevivência.



### **Aclimatização**

Nesta etapa foram utilizados os brotos de *C. fissilis* enraizados *in vitro* que apresentaram as médias estatisticamente superiores para as variáveis número de raiz por explante e comprimento da raiz.

As plantas foram retiradas dos tubos e as raízes lavadas com água corrente para remover o excesso de meio. Posteriormente, foram transferidas individualmente para copos plásticos (50 ml) contendo substrato comercial Carolina Soil autoclavado, cobertas por filme de polivinilcloro (PVC) e regadas semanalmente. Essas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente por 30 dias, quando foram avaliadas quanto à taxa de sobrevivência. Após esse período as plantas sobreviventes foram mantidas na sala de crescimento sem a cobertura de filme de polivinilcloro e regadas diariamente durante 30 dias.

### **Análise estatística**

Todos os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk para normalidade dos resíduos e de Bartlett para homogeneidade entre as variâncias. Em seguida, efetuou-se para as variáveis a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações entre as médias dos tratamentos, ambos a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2014).

### **Análise morfológica**

Realizou-se inspeção visual aos 30 dias buscando a homogeneidade nas características, tais como: pigmentação de folhas, vigor e arquitetura das plântulas e brotos (número de folhas e folíolos; número de raiz e pilosidade de raiz).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A propagação *in vitro* de *C. fissilis* demonstrou-se viável com os resultados de cada etapa, descritos abaixo, desde sua germinação e estabelecimento *in vitro* (Figura 1A e 1B), obtenção e retirada dos explantes (1C, apical-I; nodal-II; cotiledonar-III), indução de brotos e multiplicação (1D), enraizamento (1E) e aclimatização (1F).

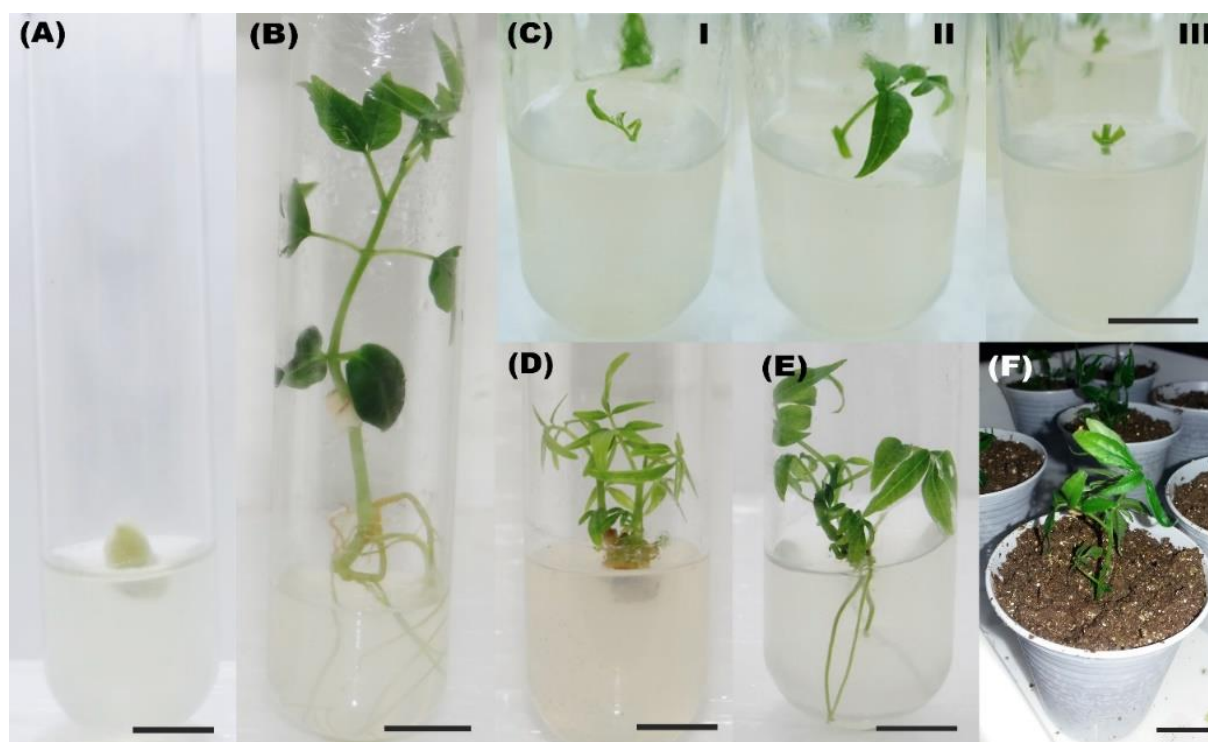


Figura 1: Estágios de desenvolvimento da pesquisa. (A) germinação *in vitro*; (B) planta com 30 dias, ponto de extração dos explantes; (C) explantes extraídos (I: apical; II: nodal; III: cotiledonar); (D) multiplicação *in vitro*; (E) enraizamento *in vitro*; (F) aclimatização. Barras = 1 cm.

### Germinação *in vitro* de *Cedrela fissilis* em diferentes meios de cultivo

Não houve diferenças estatísticas significativas entre a maioria das variáveis analisadas para a germinação de *C. fissilis*, exceto para o índice de velocidade de germinação (IVG) e para os dados de massa fresca e seca, que possibilitaram a observação da influência do meio de cultivo (Tabela 1).

Tabela 1: Valores médios para porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), massa fresca total (MF), massa seca total (MS), número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) de *C. fissilis* após 30 dias de inoculação em diferentes meios de cultivo.

Meios de cultura	%G	IVG	MF (mg)	MS (mg)	NF	CPA (mm)	CR (mm)
MS	72 <sup>a</sup>	1.096 <sup>b</sup>	0.984 <sup>ab</sup>	0.039 <sup>a</sup>	2.708 <sup>a</sup>	51.533 <sup>a</sup>	51.386 <sup>a</sup>
MS 1/2	82 <sup>a</sup>	1.218 <sup>a</sup>	2.782 <sup>ab</sup>	0.035 <sup>ab</sup>	2.706 <sup>a</sup>	48.303 <sup>a</sup>	57.442 <sup>a</sup>
B5	76 <sup>a</sup>	1.140 <sup>ab</sup>	0.288 <sup>b</sup>	0.037 <sup>ab</sup>	3.081 <sup>a</sup>	55.325 <sup>a</sup>	65.384 <sup>a</sup>
B5 1/2	78 <sup>a</sup>	1.210 <sup>a</sup>	4.454 <sup>a</sup>	0.033 <sup>b</sup>	3.038 <sup>a</sup>	54.462 <sup>a</sup>	45.728 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar de estatisticamente não haver diferenças entre os meios de cultivos para as variáveis porcentagem de germinação (%G), número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA) e raiz (CR), com observou-se um padrão mais uniforme no desenvolvimento das plântulas do tratamento MS ½ força, no que diz respeito aos atributos morfológicos de vigor, coloração e arquitetura das plântulas, quando comparada aos demais tratamentos (Figura 2).

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos vegetais fornecem as substâncias essenciais para o crescimento da planta: carboidratos como fonte de carbono (sacarose, glucose, maltose), macro e micronutrientes, vitaminas (tiamina, piridoxina e glicina), além de outros nutrientes como inositol, sorbitol e mio-inositol (Damião Filho, 1995; Hu e Ferreira, 1998). Segundo Caldas et al. (1998) essas substâncias presentes nos meios além de serem essenciais para o crescimento dos tecidos, controlam o aspecto de desenvolvimento *in vitro*.

Embora não exista uma formulação padrão de meio nutritivo para espécies nativas, o meio MS e o B5 são os mais comumente utilizados na cultura de tecidos de grande maioria das espécies (Caldas et al., 1998). Esse fato, corrobora com os resultados obtidos, que independente da formulação usada ser a original (força total) ou fracionada (½ força), ambos os meios

testados podem ser empregados para a germinação *in vitro* de *C. fissilis* sem que haja diferença significativa no percentual de planta germinadas.

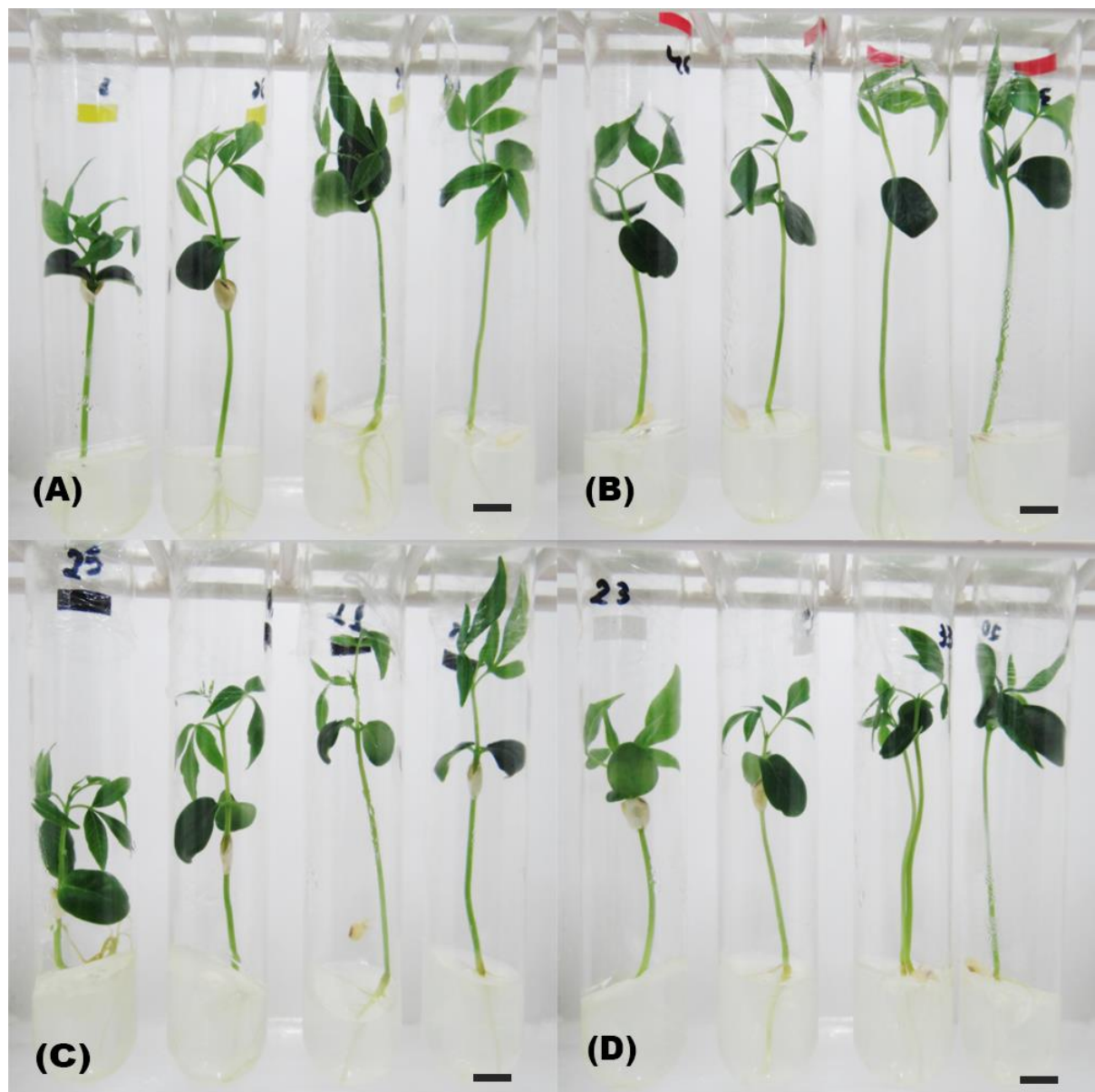


Figura 2: Padrão morfológico das plantas de *C. fissilis* germinadas nos diferentes meios de cultivo. (A) MS, (B) MS 1/2 força, (C) B5, (D) B5 1/2 força. Barras = 1 cm.

Entretanto, quando levamos em conta a velocidade da germinação, temos um favorecimento nos meios com as concentrações de sais reduzidas. Esses resultados devem-se à rápida embebição das sementes em meios com concentrações reduzidas de sais, tendo em vista

a diferença entre os potenciais hídricos do meio externo e interno às membranas da semente, que propiciam o movimento da água, sempre do potencial hídrico mais elevado para o mais baixo ou mais negativo (Castro et. al., 2004), neste caso favorecido pelos meios MS ½ força e B5 ½ força.

Pode-se observar ainda que o meio B5 ½ força dentre os testados foi o que permitiu maior entrada de água nas plantas, como comprovado na Tabela 1 pelos valores de massa fresca (MF) e massa seca (MS), o que se justifica pela sua menor concentração de sais, principalmente os nitrogenados, quando comparado aos outros meios de cultivo testados.

Bhojwani e Razdan (1996) e Pereira et al. (2000) relatam que para algumas espécies nativas, meios com concentração reduzida dos sais favorecem melhor crescimento das plantas em cultivos *in vitro*, pois para algumas espécies, a concentração total dos sais nas formulações comerciais é tóxica ou desnecessariamente alta.

Contudo, os custos de cada meio de cultivo devem ser considerados, visto que mesmo sendo uma tecnologia com várias vantagens, a produção de mudas *in vitro* ainda apresenta um custo elevado (Ribeiro et. al., 2013). Considerando o exposto, o meio MS ½ força tem um custo mais baixo quando comparado aos outros meios testados. Soma-se a isso, a uniformidade das plântulas desenvolvidas nesse meio, que mesmo que não apresente diferenças numéricas e estatísticas em variáveis como número de folhas ou comprimento de parte aérea e raiz, fornece de forma mais homogênea matéria-prima para as próximas etapas da micropropagação.

De maneira geral, o uso do MS ½ força como meio de cultivo para a germinação e o estabelecimento *in vitro* da propagação de *Cedrela fissilis*, nos permite uma redução de custo, bem como uma redução no tempo necessário para que as plântulas atinjam o ponto de extração dos explantes. Essa inferência pode ser feita, visto que a maior parte das sementes germinam (%G) e atingem o momento de retirada dos segmentos (IVG) em menos tempo que os demais meios testados.

### Multiplicação *in vitro* de explantes de *C. fissilis* sob concentrações diferentes de citocininas

Com base na análise de variância, não houve interação tripla entre os fatores (explantes x citocininas x concentrações). Observa-se apenas interação dupla entre o fator explante e o fator concentração (Figura 3) e não se verifica ação significativa das diferentes citocininas testadas.

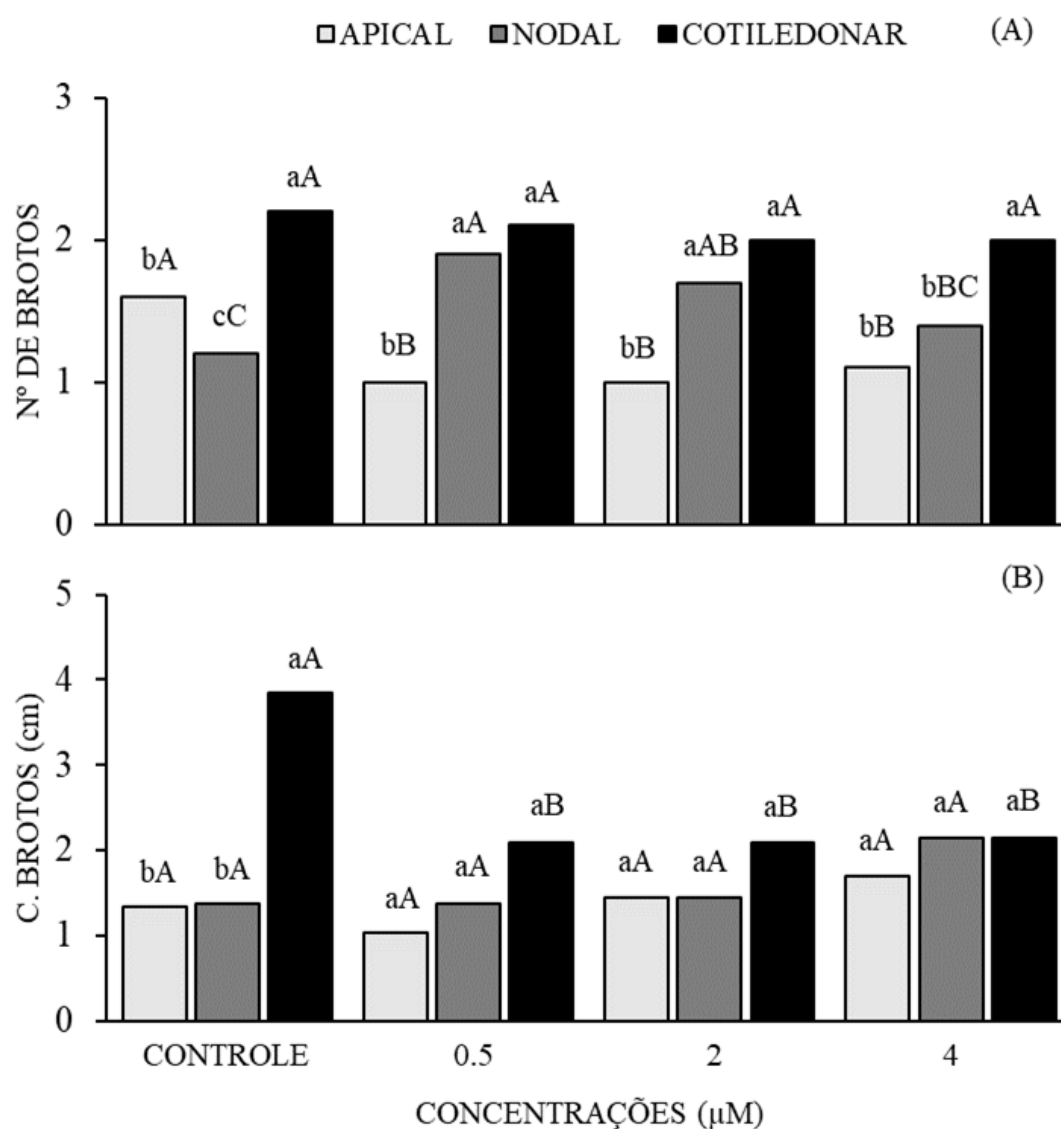


Figura 3: Média do número (A) e do comprimento (B) dos brotos regenerados a partir de explantes apicais, nodais e cotiledonares de *C. fissilis* sob a influência das diferentes concentrações de citocininas após 30 dias de cultivo. As letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as diferentes concentrações, letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes tipos de explantes no mesmo tratamento de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com o exposto na Figura 3A, podemos destacar que não houve variação expressiva no número médio de brotos por explante, ao longo do gradiente de concentrações das citocininas testadas. Verifica-se apenas um pico na média do explante apical na ausência de citocinina exógena (controle) com 1.6 brotos por explante, bem como uma elevação na média do explante nodal, entre o controle e o tratamento com 0.5  $\mu$ M de citocinina, variando de 1.2 para 1.9 brotos por explante.

Pode-se constatar, também, que o explante cotiledonar exibiu uma média de 2 brotos por explante na maioria dos tratamentos, com valor superior apenas no controle (2.2). Tais resultados nos permitem afirmar que o gradiente de variação das concentrações de citocininas fornecido, não favoreceu um incremento no número de brotos, a ponto de considerarmos essencial seu acréscimo.

Em relação ao comprimento (Figura 3B), os brotos regenerados, a partir do uso do segmento cotiledonar como explante, exibiram média de comprimento de 3.84 cm, estatisticamente superior aos demais segmentos testados, que não apresentaram valores maiores que 2 cm. Costa et al. (2010) estudando a propagação *in vitro* de *Erythrina velutina* (Fabaceae) obtiveram brotos com comprimentos maiores utilizando o nó cotiledonar como explantes, o que atesta a eficácia no uso de segmento cotiledonar observada no presente estudo.

Embora o mecanismo preciso ainda não esteja claro, o efeito genotípico na regeneração e alongamento das brotações foi descrito em muitas espécies e pode ser, em parte, devido às diferenças nos níveis de hormônios endógenos (Pellegrineschi, 1997; Schween e Schwenkel, 2003). Logo, a razão entre citocinina e auxina endógenas pode explicar a média mais elevada encontrada para o explante cotiledonar no tratamento controle. Esse fato, permite que consideremos a atuação da dominância apical, visto que o acréscimo de citocinina exógena, mesmo que em pequena dosagem, já foi o suficiente para que o crescimento dos brotos caísse

pela metade, alterando o balanço auxina/citocinina. Entretanto, o favorecimento da razão em relação à citocinina não promoveu um acréscimo proporcional no número de gemas laterais.

O fator explante impactou significativamente na taxa de multiplicação de *C. fissilis* para o número médio de brotos por explante (3.84) e comprimento dos brotos (2.2 cm). Thorpe (2007) afirma que, teoricamente, qualquer tecido vegetal pode ser usado como explante, tendo em vista a totipotencialidade das células vegetais. Porém, o tipo de explante utilizado na técnica de micropropagação pode determinar a rapidez e a eficiência do processo, justificando a opção por explantes que contenham maior proporção de tecidos meristemáticos ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (Akin-Idowu et al., 2009). Assim, na seleção dos explantes devem ser considerados aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação (Wendling et al., 2006).

Morfologicamente, o explante cotiledonar é composto por duas gemas axilares, fato que possibilita, no mínimo, o surgimento de dois novos brotos quando cultivados *in vitro*. Já o segmento apical é composto por apenas uma gema, possibilitando um broto novo como número mínimo. Entretanto, nesse observou-se em algumas unidades o desenvolvimento de mais de um broto por explante, justificando a média superior ao número de meristemas disponíveis no segmento.

Em relação ao segmento nodal, como o padrão da família Meliaceae são folhas alternas ou raramente opostas (Souza e Lorenzi, 2012), a média do número de brotos é intermediária às demais, visto que a quantidade de gemas axilares é variável, dependente do desenvolvimento da planta na etapa de germinação.

Observou-se em parte dos brotos regenerados o surgimento de raízes, sem que houvesse o acréscimo de reguladores de crescimento favorecedores ao surgimento de raiz (auxinas). Essa observação, permitiu que evidenciássemos certa capacidade rizogênica dos tecidos de *C. fissilis*, principalmente nos brotos regenerados a partir dos segmentos cotiledonares. Esses



apresentaram maior percentual (%) de enraizamento, com 45%, comparado aos 20 e 25% do explante apical e nodal, respectivamente. Em detrimento da porcentagem de presença de raiz nos brotos regenerados, retoma-se o raciocínio da razão endógena de auxina e citocinina como sendo uma explicação plausível para as respostas obtidas em relação à multiplicação *in vitro* de *C. fissilis*.

Estudos similares realizados por Nunes et al. (2002), com plântulas germinadas *in vitro* a partir de sementes da mesma região das utilizadas no presente estudo, apontam que a associação de auxinas e citocininas na etapa de multiplicação de brotos exibem resultados semelhantes em relação ao número de brotos regenerados (média de 2,6 brotos por explante), diferindo em relação ao comprimento (> 3,0 cm). Assim, esse balanço pode agir intensamente sobre a dominância apical exercida pela razão endógena dos mesmos e permitir um maior crescimento dos brotos.

Somando-se aos melhores resultados estatísticos encontrados para o explante cotiledonar, foi possível também observar a homogeneidade morfológica dos brotos regenerados a partir desse segmento em comparação com demais explantes testados (Figura 4).

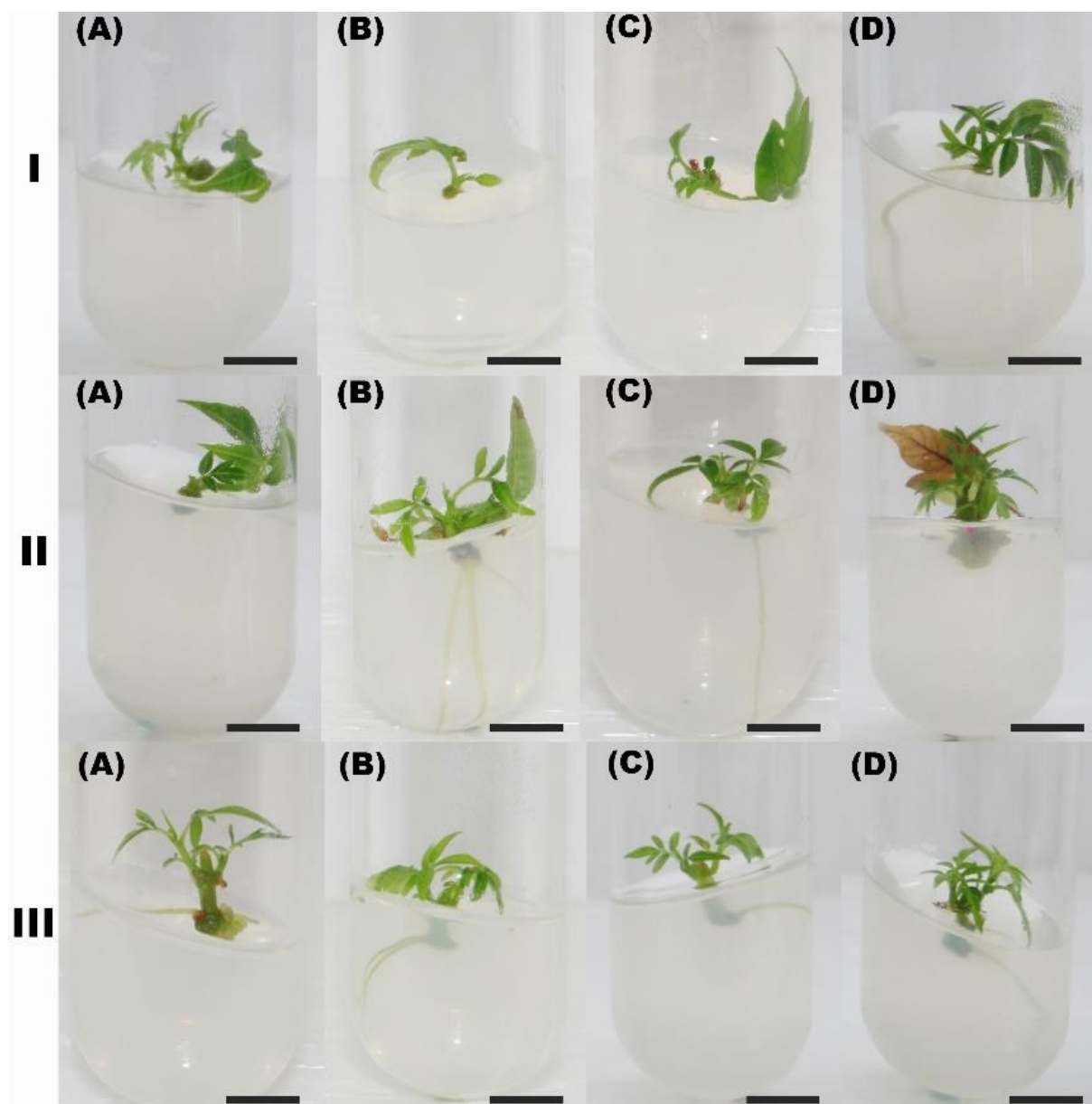


Figura 4: Padrão morfológico dos brotos regenerados de *C. fissilis* a partir do explante apical (I), nodal (II) e cotiledonar (III) nas diferentes concentrações de citocinina [(A) 0  $\mu\text{M}$ ; (B) 0.5  $\mu\text{M}$ ; (C) 2  $\mu\text{M}$ ; (D) 4  $\mu\text{M}$ ], após 30 dias de cultivo. Barras = 1 cm.

### **Enraizamento *in vitro* de *C. fissilis* sob diferentes concentrações de auxinas**

Todos os tratamentos testados favoreceram o enraizamento dos brotos regenerados (Figura 5A). Os maiores valores para essa variável foram observados para o tratamento AIB 3  $\mu\text{M}$ , da mesma forma que para o número de raiz por explante (Figura 5B).

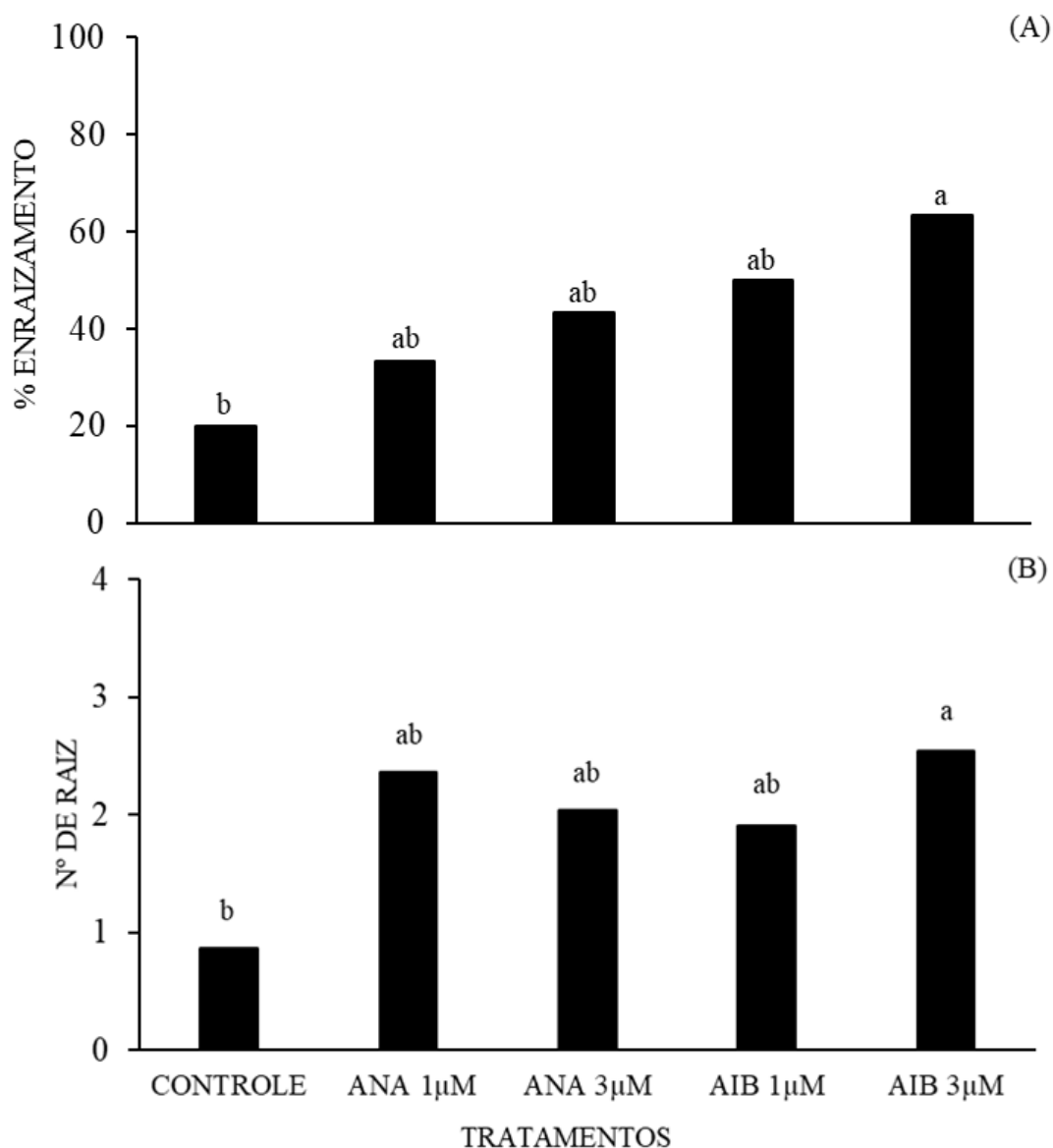


Figura 5: Porcentagem de enraizamento dos brotos regenerados (A) e média do número de raízes por explante (B) de *C. fissilis* submetidos aos tratamentos com ANA e AIB em diferentes concentrações (0; 1 e 3 µM) após 30 dias de cultivo *in vitro*. Colunas com letras iguais não diferem entre si de acordo com o teste Tukey a 5%.

Observa-se que a porcentagem de enraizamento exibiu um aumento progressivo diretamente proporcional ao aumento das concentrações de auxina exógena e também com a alteração do tipo de auxina fornecida. O tratamento que obteve numericamente a maior porcentagem de enraizamento foi o meio de cultivo contendo AIB 3µM, 63.3%.

Resultados diferentes foram demonstrados para a porcentagem de sobrevivência e para a média do número de raiz por explante, que exibiram uma flutuação de resultados dentro dos tratamentos, igualando-se apenas no controle, que resultou nos dados mais baixos, 20% e 0.86, respectivamente. Constatou-se novamente que os resultados numericamente maiores foram encontrados para o tratamento suplementado com AIB 3 $\mu$ M, 100% de sobrevivência e média de 2.54 raízes por explante.

Maruyama et al. (1989) encontraram como resultados para *Cedrela odorata* (Meliaceae) a melhor porcentagem de enraizamento (73%) e uma média de 3,7 raízes por explante usando AIB 2,5 $\mu$ M, resultados bem próximos do encontrado no presente estudo.

De acordo com George (1996), a presença de auxina é necessária para a indução do enraizamento em segmentos caulinares. Dentre as auxinas comumente utilizadas na cultura de tecidos, o AIB tem sido muito utilizado em razão da baixa fitotoxicidade aos explantes, proporcionando resultados positivos ao enraizamento *in vitro*, como o demonstrado para *Caryocar brasiliense* (Santos et al., 2006), *Ocotea porosa* (Pelegri et al., 2011) e *Parapiptadenia rigida* (Kielse, 2009). Contudo, em geral, as respostas são dependentes do material genético, sendo influenciadas pela composição do meio de cultura, o tipo e concentrações de auxina (Oliveira et al., 2013).

Com a análise dos aspectos morfológicos podemos constatar que há desenvolvimento de raízes em todos os tratamentos, porém essas são normalmente desprovidas de pelos radiculares e pouca ramificadas, proporcionando um sistema radicular menos adequado do ponto de vista morfológico (Figura 6), gerando consequências para o posterior transplante e aclimatização para as condições *ex vitro*.

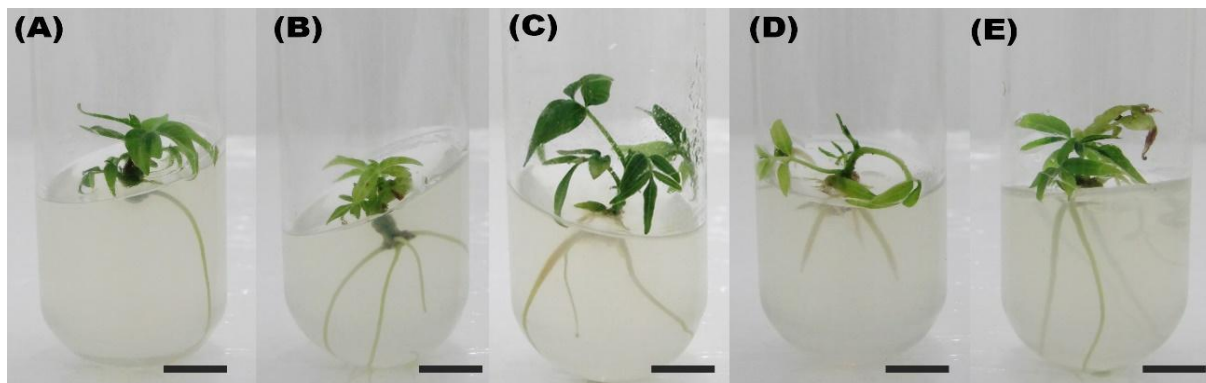


Figura 6: Padrão morfológico dos brotos enraizados de *C. fissilis* nas diferentes concentrações de reguladores de crescimento [(A) CONTROLE; (B) ANA 1  $\mu\text{M}$ ; (C) ANA 3  $\mu\text{M}$ ; (D) AIB 1  $\mu\text{M}$ ; (E) AIB 3  $\mu\text{M}$ ], após 30 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 1 cm.

### Aclimatização

Das 60 plântulas com raízes levadas para a etapa de aclimatização, 10% sobreviveram ao processo durante as etapas inicial - com cobertura de polivinilcloreto (PVC). Após 30 dias, essas não exibiram acréscimo no número de folhas e nem no comprimento. Com a retirada do filme PVC, as plântulas sobreviveram por apenas um período de 15 dias.

A aclimatização - passagem das plantas desenvolvidas *in vitro* para o ambiente *ex vitro* - pode ser um fator limitante no processo da micropropagação (Rocha et al., 2008), por exibir baixa taxa de sobrevivência das mudas após o transplante. Essa deficiência na etapa final do processo de propagação *in vitro* deve-se, normalmente, às características das raízes formadas nos meios solidificados com ágar, que não são funcionais e exibem formação escassa de pelos radiculares, comprometendo a fase de aclimatização (Pierik, 1990; Tibola et al., 2004).

Silva et al. (2011) relata que o maior problema durante a aclimatização *ex vitro* é resultante de uma alta perda de água pela transpiração, ou ainda, as raízes formadas *in vitro* que nem sempre são eficientes na absorção de água e de nutrientes no momento da passagem das plântulas que estavam *in vitro* para o substrato. Isto posto, é possível que a falta de pelos nas

raízes seja a causa da baixa taxa de sobrevivência observada nesta etapa, visto que como evidenciado na Figura 5, as raízes desenvolvidas não os exibem.

Todavia, mesmo plantas com aspecto morfológico considerado normal, podem não sobreviver, em consequência de uma somatória de fatores, dentre eles o estresse que as plantas sofrem, devido à súbita mudança na umidade relativa; por passarem para um estado autotrófico, onde necessitam da fotossíntese para sobreviver; e estarem agora, sujeitas ao ataque de microrganismos (Tibola et al., 2004).

Alterações no protocolo de aclimatização devem ser consideradas para remediar a baixa taxa de sobrevivência e alcançar os propósitos da micropropagação. Uma etapa de pré-aclimatização, ainda *in vitro*, mediante redução na concentração de sacarose, buscando uma condição mais autotrófica, aumentaria, segundo Silveira et al. (2013) a capacidade fotossintética das plantas no processo de transição *in vitro/ex vitro*.

Além dessa, outro fator passível de alteração é a forma como a planta, retirada do ambiente estéril entra em contato com o ambiente *ex vitro*. Desse modo, a transferência das condições *in vitro* para o crescimento em ambiente externo deve se dar de forma mais gradativa (Rocha et al., 2008).

De acordo com Jackson (2003) a condição asséptica necessária ao ambiente de cultivo *in vitro*, requer severo selamento dos recipientes, o que impede as trocas gasosas com o ambiente - trocas essas necessárias ao bom desenvolvimento das plantas. Assim a realização de perfurações nas tampas dos tubos e frascos em um curto período antecedente ao momento de transferência, bem como nos momentos iniciais da aclimatização, podem ser de grande relevância para essa etapa de transição (Santana et al., 2008).

Além do controle de umidade e condições de cultivo, outro fator de elevada importância na aclimatização, é o tipo de substrato. Calvete et al. (2000), considera que as propriedades do substrato podem facilitar ou impedir o desenvolvimento das plantas. O autor afirma ainda, que

o espaço de aeração associado à capacidade de retenção de água, são fundamentais para o sucesso dessa etapa, e diferem de acordo com o substrato utilizado.

Sendo assim, a seleção do substrato é fundamental no que tange o crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas, influenciando diretamente no sucesso da aclimatização. Porém, diante da diversidade dos substratos e de suas características, torna-se difícil escolher o substrato ou a mistura, que atenda às condições para o ótimo crescimento e desenvolvimento das plantas (Couto et al., 2003). A substituição do agente geleificante por fibras ou materiais de suporte aerados ou porosos, como a vermiculita ou as fibras de celulose, podem ser alternativas mais baratas e podem fornecer resultados satisfatórios para espécies arbóreas ainda na fase de enraizamento, o que facilitaria o processo de aclimatização (Kozai e Kubota, 2001).

## CONCLUSÃO

Diante do acima exposto, meios de cultura com menor concentração de seus compostos são mais adequados à germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de *Cedrela fissilis*.

Recomenda-se, portanto, para maximização do cultivo *in vitro* de cedro-rosa, a germinação em meio MS ½ força, que, além de menor custo, proporcionou maior porcentagem de plantas germinadas (82); exibiu valor de IVG estatisticamente superior e resultou em plântulas mais homogêneas. Sendo assim, com menor investimento no meio de cultivo e num período de tempo relativamente mais curto (30 dias), o cultivo de *C. fissilis* em meio MS ½ força, já fornece insumo necessário ao início das etapas de propagação *in vitro*.

Para a técnica de micropropagação, na etapa de indução de brotos, o segmento cotiledonar cultivado em meio MS sem citocinina, resulta em maior número de brotos, o que reduz o custo dessa etapa, visto que não havendo necessidade da suplementação de citocinina, essa pode ser descartada do processo de multiplicação *in vitro*, o que gerará uma economia de

insumo. Ressalta-se que em culturas com subcultivos repetitivos, no caso de produção em grande escala, o gasto com citocinina nessa etapa é alto.

A fase de enraizamento não exibiu diferenças estatísticas entre as auxinas testadas, entretanto o AIB 3  $\mu\text{M}$ , favoreceu o surgimento de raízes adventícias em maior parte dos explantes, fazendo com que este seja o recomendando para um posterior protocolo.

A fase de aclimatização não exibiu resultados compatíveis com a técnica de micropropagação, e, portanto, requer maior atenção em casos de produção para fins comerciais.

Conclui-se, então que *Cedrela fissilis* exibe características que favorecem o estabelecimento de protocolos consistentes para micropropagação. Essa tecnologia pode fornecer uma ferramenta valiosa em programas de melhoria de árvores e de transformação genética.

Esse resultado pode ainda, em estudos posteriores, alcançar condições de aclimatização mais favoráveis às exigências das demandas comerciais, atingindo um valor social e ecológico incomensurável.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida e à Flora Tietê Associação de Recuperação Florestal (Penápolis-SP) pela doação das sementes de *Cedrela fissilis*.

## **REFERÊNCIAS**

AKIN-IDOWU, P. E., IBITOYE, D. O., ADEMOYEGUN, O. T. (2009). Tissue culture as plant production technique for plant horticultural crop. **African Journal of Biotechnology**, 8(16): 3782-3788.



- BARSTOW, M. (2018) *Cedrela fissilis*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2018**.  
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T33928A68080477>. Acessado em 16/01/2019.
- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. (1996) Clonal Propagation. In: Bhojwani, S.S.; Razdan, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Elsevier Science Publishers, 5: 483-536.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. (1998) Meios nutritivos. Em: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMPRAPA-CNPH, Vol.1, 87-132 p.
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; DAUDT, R. (2000) Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. Em: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substrato para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Genesis, p.257-264.
- CARVALHO, P. E. R. (1994) **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo, PR. EMBRAPA – CNPF/SPI. 639 p.
- CASTRO, R. M.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. (2004) Embebição e reativação do metabolismo. Em: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed. p. 251-262.
- CNCFlora - Centro Nacional De Conservação Da Flora (2013) **Livro vermelho da flora do Brasil**. MARTINELLI, G., MORAES, M. A. (orgs). 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. (2010) Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, 40(5): 1090-1096.
- COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A.C. (2003) Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano (*Prunus*

- cerasifera* ehrh.) Em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, 9(2): 125-128.
- DAMIÃO FILHO, C. F. (1995) **Cultura de tecidos de plantas: micropropagação**. Jaboticabal: FUNEP, 25p.
- EL-LAKANY, M. H. (1992) Rapid propagation of fast-growing tree species in developing countries; its potentials, constraints and future developments. Em: BAKER, F. W. G. **Rapid propagation of fast-growing tree species**. Melkshan: Redwood Press, CASAFA report series n. 3, p. 102-108.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. (2005) Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, 35(4): 961-965.
- FERREIRA, D. F. (2014) Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, 38(2):109- 112.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151-158.
- GEORGE, E. F. (1996) **Plant propagation by tissue culture; Part 2 in practice**. 2.ed. Edington: Exegetics 1361 p.
- HAINES, R. (1994) **Biotechnology in Forest tree improvement with special reference to developing countries**. Rome: FAO/IBPGR Forest Paper n. 118, 230 p.
- HU, C. Y., FERREIRA, A. G. (1998) Cultura de embriões. Em: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, Vol. 1, 371-394 p.
- JACKSON, M. B. (2003) Aeration stress in plant tissue cultures. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**. Special issue, p. 96-109.
- KIELSE, P.; FRANCO, E. T. H.; PARANHOS; J. T.; LIMA, A. P. S. (2009) Regeneração in vitro de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, 39(4): 1088-1094.

- KOZAI, T; KUBOTA, C. (2001) Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, 114: 525-537.
- KUMAR, N. E REDDY, M. (2011). In vitro Plant Propagation: A Review. **Journal of Forest and Environmental Science**. 27(2): 61-72.
- LORENZI, H. (2008) **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5.ed. Nova Odessa, v.1. 384 p.
- MARUYAMA E, ISHII K, SAITO A & MIGITA K. (1989) Micropropagation of cedro (*Cedrela odorata* L.) by shoot-tip culture. **Journal of the Physical Society of Japan**71: 329–331.
- MORITZ, A.; DEGENHARDT, J.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A.; LIMA, B. H. DE; FRANCESCHI, C. DO R. B.; FRANCISCON, L. (2009) Estabelecimento *in vitro* de *Ocotea odorifera*, *O. catharinensis* e *O. porosa*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 59: 37-44.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15(3): 473-497.
- NUNES, E. C., CASTILHO, C. V., MORENO, F. N., VIANA, A. M. (2002) *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell. Tissue and Organ Culture**, 70(1): 259-268.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C. E BRONDANI, G. E. (2013) Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 33(76): 439-453.
- OSANI, O. M.; PANDE, V.; NAILWAL, T. K. (2018) A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 7(7): 3778-3786.

- PELEGRINI, L. L.; RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KOEHLER, H. S. (2011) Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, 10(9): 1527-1523.
- PELLEGRINESCHI, A. (1997) *In vitro* plant regeneration via organogenesis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] **Plant Cell Reports**, 17: 89-95.
- PEREIRA, A.; BERTONI, B.; MORAES, R.; FRANÇA, S. (2000) Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, 2(2): 17-21.
- PIERIK, R. L. M. (1990) **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundi -Prensa, 326 p.
- PIJUT, P. M.; BEASLEY, R. R.; LAWSON, S. S.; PALLA, K. J.; STEVENS, M. E., WANG, Y. (2012) *In vitro* propagation of tropical hardwood trees species – A review (2001-2011). **Propagation of ornamental plants**. 12(1): 25-51.
- QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R.; ASSIS, L.; ALVES, F. M. (2015) Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8476>>. Acessado em 04/03/2019.
- RIBEIRO, J. M.; NATONIEL, M. F.; COELHO, A. K. N. S.; PINTO, M. S. T. (2013) Uso da rapadura como meio nutritivo para cultivo in vitro de bananeira cv. Maçã. **Revista Ceres**, 60(5): 722-725.
- RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. (1976) **Botânica Econômica Brasileira**. São Paulo: Ed. EPU. 207 p.
- ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. (2008) Enraizamento in vitro e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30(3): 769-774.

- RUIZ FILHO, R.R.; SANTOS A.F. DOS; MEDEIROS, A.C.S.; JACCOUD FILHO, D.S. (2004) Fungos associados às sementes de cedro. **Summa Phytopathologica**, 30(4): 494-496.
- STEFANO, M. V.; CALAZANS, L. S. B.; SAKURAGUI, C. M. (2015). Meliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9990>>. Acessado em 16/01/2019
- SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. (2008) estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, 32(1): 80-86.
- SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, D. P. C.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. O. (2006) Micropropagação de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28(2): 293-296.
- SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. (2013) Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, 29(2): 408-411.
- SCHWEEN, G., SCHWENKEL, H.G. (2003) Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in greenhouse of *Primula* ssp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 72: 53-61.
- SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; SCHEIDT, G. N. S.; CARVALHO, D. C.; SANTOS, J. D.; GUERRA, E. P. (2011) Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, 9(2): 179-184.

- SILVA, J. M. O. D.; OLTRAMARI, A. C.; MARASCHIN, M. PEDROTTI, E. (2001) Cultura de embriões imaturos e organogênese: aspectos biotecnológicos da canela sassafrás. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 20: 44-48.
- SILVEIRA, D. G.; VIDAL, A. M.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, F. V. D. (2013) Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agronômica**, 44(3): 544-553.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. (2012) **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3ªed. Nova Odessa, 768p.
- THORPE, T. (2007). History of plant tissue culture. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 37: 169-180.
- TIBOLA, C. T.; RADMANN, E. B.; RODRIGUES, A. C.; FORTES, G. R.; FACHINELLO, J. C. (2004) Diferentes meios de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Agrociência**, 10(2): 191-195.
- WATANABE, K. N.; RAMAN, K. V. (1997) Plant biotechnology and plant genetic resources: a global perspective. Em: Watanabe, K. N.; Pehu, E. **Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity**. Austin: Academic Press, 1997. p.1-13.
- WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F. (2006) **Produção de mudas de espécies lenhosas**. (Embrapa Florestas. Documentos, 130). Colombo: Embrapa Florestas. 54 p.
- WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, KAMILA, V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. (2009) Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, 33(6): 987-996.
- WERNER, E. T.; PESSOTTI, K. V.; LOPES F. P.; CUZZUOL, G. R. F. (2007) Indução da calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, 5(2): 1053-1055.