

Protocolo para obtenção de plantas de *Cedrela odorata* L. através da cultura de tecidos

Protocol for obtaining *Cedrela odorata* L. plants through tissue culture

Protocolo de obtención de plantas de *Cedrela odorata* L. mediante cultivo de tejidos

Recebido: 01/12/2020 | Revisado: 07/12/2020 | Aceito: 11/12/2020 | Publicado: 14/12/2020

Osmar Alves Lameira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8370-8562>

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Amazônia Oriental, Brasil

E-mail: osmar.lameira@embrapa.br

Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9181-264X>

Fazenda Agroecológica São Roque, Brasil

E-mail: iracema3c@gmail.com

Meiciane Ferreira Campelo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7511-4377>

Universidade Federal do Pará, Brasil

E-mail: meicianecampelo@gmail.com

Resumo

O trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo básico para micropropagação de plantas de *Cedrela odorata* L. a partir de plântulas germinadas *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental. Para a desinfestação das sementes foram testadas solução de hipoclorito de sódio a 0; 1,0; 1,5 e 2,0% por 10, 15 e 20 minutos. Para indução de brotações em meio MS foi testada 5 concentrações de BAP e 2 tipos de segmentos e no enraizamento foi utilizado 0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹ de ANA. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado ou em arranjo fatorial de acordo com os tratamentos analisados. Os dados obtidos, nos diferentes experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados demonstraram que o uso de hipoclorito de sódio a 2,0% por 15 minutos apresentou a menor percentagem de contaminação das sementes. O tratamento com 1 mg. L⁻¹ de BAP promoveu o maior número e comprimento de brotos em segmentos apicais e com acréscimo de 2 g.L⁻¹ de sacarose induziu o surgimento de brotos em segmentos caulinares. O maior número e comprimento de raiz/explante foi obtido com 1 mg.

L⁻¹ de ANA. É possível obter planta completa de *Cedrella odorata* a partir de sementes desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2,0 %, e o uso de 1 mg. L⁻¹ de BAP e ANA para indução de brotações e enraizamento, respectivamente.

Palavras-chave: Crescimento *in vitro*; Micropropagação; Citocininas; Auxinas.

Abstract

The work aimed to develop a basic protocol for micropropagation of *Cedrela odorata* L. plants from seedlings germinated *in vitro*. The experiments were conducted at the Embrapa Amazônia Oriental Genetic Resources and Biotechnology laboratory. For the disinfection of seeds, sodium hypochlorite solution was tested at 0; 1.0; 1.5 and 2.0% for 10, 15 and 20 minutes. For budding induction in MS medium, 5 concentrations of BAP and 2 types of segments were tested and rooting was used 0; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5 mg.L⁻¹ of ANA. The design used was completely randomized or in a factorial arrangement according to the treatments analyzed. The data obtained in the different experiments were subjected to analysis of variance and the means compared by the Tukey test at 5% probability. The results showed that the use of 2.0% sodium hypochlorite for 15 minutes showed the lowest percentage of contamination of the seeds. Treatment with 1 mg. L⁻¹ of BAP promoted the largest number and length of shoots in apical segments and with the addition of 2 g.L⁻¹ of sucrose induced the appearance of shoots in stem segments. The largest number and length of root / explant was obtained with 1 mg. ANA L⁻¹. It is possible to obtain a complete *Cedrella odorata* plant from disinfected seeds in 2.0% sodium hypochlorite solution, and the use of 1 mg. L⁻¹ of BAP and ANA for budding induction and rooting, respectively.

Keywords: *In vitro* growth; Micropropagation; Cytokinins; Auxins.

Resumen

El trabajo tuvo como objetivo desarrollar un protocolo básico para la micropropagación de plantas de *Cedrela odorata* L. a partir de plántulas germinadas *in vitro*. Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Biotecnología y Recursos Genéticos de Embrapa Amazônia Oriental. Para la desinfección de semillas, se probó la solución de hipoclorito de sodio a 0; 1,0; 1,5 y 2,0% durante 10, 15 y 20 minutos. Para la inducción de gemación en medio MS, se probaron 5 concentraciones de BAP y 2 tipos de segmentos y se utilizó enraizamiento 0; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mg. L⁻¹ de ANA. El diseño utilizado fue completamente al azar o en arreglo factorial según los tratamientos analizados. Los datos obtenidos en los diferentes experimentos se sometieron a análisis de varianza y se compararon las medias mediante la

prueba de Tukey al 5% de probabilidad. Los resultados mostraron que el uso de hipoclorito de sodio al 2.0% durante 15 minutos mostró el menor porcentaje de contaminación de las semillas. Tratamiento con 1 mg. L⁻¹ de BAP promovió la mayor cantidad y longitud de brotes en segmentos apicales y con la adición de 2 g. L⁻¹ de sacarosa indujo la aparición de brotes en segmentos de tallo. El mayor número y longitud de raíz / explante se obtuvo con 1 mg. ANA L-1. Es posible obtener una planta completa de *Cedrella odorata* a partir de semillas desinfectadas en solución de hipoclorito de sodio al 2,0% y el uso de 1 mg. L⁻¹ de BAP y ANA para inducción de gemación y enraizamiento, respectivamente.

Palabras clave: Crecimiento in vitro; Micropropagación; Citoquininas; Auxinas.

1. Introdução

A *Cedrela odorata* L. é utilizada em produtos madeireiros como esculturas, instrumento musical, construção civil, carvão, carpintaria, marcenaria, chapas, compensados e também em produtos não madeireiros, bem como, artesanato, medicinal e óleo (Carvalho, 2010). Além de possuir potencial paisagístico também pode ser empregada na recuperação de áreas degradadas justificando seu alto valor comercial o que a torna ameaçada pela sua intensa exploração sendo classificada no status de conservação como VU - Vulnerável. É uma espécie decídua, seletiva higrófita, da família Meliaceae, cujo Bioma/Fitofisionomia enquadrasse na Amazônia (Floresta de Várzea, Floresta Ombrófila), Mata Atlântica (Floresta Ciliar e Floresta Estacional Semidecidual), Cerrado e Caatinga, (Sakuragui et al. 2012).

O método de propagação usual do cedro é em sua grande parte via seminal. Entretanto, a oferta sazonal das sementes e sua curta viabilidade ao decorrer do tempo representa um problema para o cultivo contínuo de mudas somando-se ao fato, que a produção de mudas no viveiro é suscetível ao ataque das gemas apicais pela *Hypsipyla grandella* (broca-do-cedro), o que tem limitado o seu uso em plantios e diminuindo sua capacidade de expansão comercial (Carvalho 1994).

O acometimento de *Hypsipyla grandella* afeta o crescimento em altura e diâmetro, e favorece a ocorrência de bifurcação e de mortalidade das plantas de mogno em monocultivo e em plantios mistos, (Maestri et al., 2020). Os danos causados por essa praga em árvores nativas da família Meliaceae são tão intensos e severos que inviabilizam o manejo florestal industrial com a espécie *Cedrela odorata* L. Portanto, o desenvolvimento de uma estratégia que vise à silvicultura comercial tem grande relevância para atender as demandas do mercado consumidor e garantir a conservação da espécie.

Nesse sentido, a aplicação das técnicas de cultura de tecidos associadas à micropropagação onde o cultivo *in vitro* de diversos tipos de explantes quando submetidos em meio de cultura e com condições ambientais controladas podem promover a competência de originar novos órgãos, devido à totipotência da célula vegetal, (Roussos et al., 2016; Bianchetti et al., 2017). Nesse sentido, a micropropagação mostra-se como uma possível opção aos métodos convencionais para produção de plantas de Meliaceae (Aragão et al., 2016).

Sendo assim o objetivo do trabalho foi desenvolver um protocolo básico de obtenção de plantas de *Cedrela odorata* L. através da cultura de tecidos com a finalidade de obter plantas assépticas de material de origem seminal em escala massal.

2. Metodologia

2.1 Local e condições experimentais

Sementes de *C. odorata* foram coletadas no campo experimental da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, foram acondicionadas em saco de papel Kraft em geladeira e submetidas aos tratamentos experimentais no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia de Plantas da mesma instituição. O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) com pH ajustado em $5,8 \pm 0,2$ suplementado com fitorreguladores. Os meios de cultura foram distribuídos em tubos de ensaio, lacrados com papel alumínio e esterilizados por autoclavagem por 20 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm. As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com álcool a 70%, e posteriormente os tubos foram colocados em sala de crescimento sob fotoperíodo de 12 h.luz.dia⁻¹ com luminosidade de 25µmol.m².s⁻¹ de irradiância e temperatura de 25±2°C pelo período de dois meses.

2.2 Assepsia e germinação de sementes

Sementes de *C. odorata* foram submetidas a várias lavagens com água corrente e detergente comercial. Posteriormente, foram imersas em álcool 70% por 1 min e submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0; 1,0; 1,5 e 2,0% de cloro ativo combinados aos tempos de imersão de 10, 15 e 20 minutos e submetidas a 3 enxágues em água destilada e autoclavada. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio

contendo 10 mL de meio de cultura MS com 3% de sacarose e solidificado a 0,7% de ágar. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições e 5 tubos em cada repetição, tendo como testemunha parcelas sem aplicação de NaOCl, totalizando 200 tubos no experimento. A avaliação da percentagem de contaminação e germinação das sementes se fez aos 7 e 15 dias após a inoculação.

2.3 Induções das brotações

Foram realizados dois experimentos para indução de brotos. Os segmentos caulinares apicais e nodais utilizados foram retirados de plantas assépticas com 60 dias obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro*. Os explantes foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS, solidificado com 0,7% de ágar, na quantidade de 10 mL por tubo de ensaio. Em ambos as avaliações foram realizadas em intervalos de 15 dias quanto ao número e o comprimento de brotações no período total de 45 dias.

2.3.1 Efeito 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotos em segmentos apicais e nodais

No experimento I foram utilizados explantes de segmentos nodal e apical, com tamanho aproximado de 1 cm e uma gema axilar. Ao meio de cultura MS foi acrescido 3% de sacarose e diferentes concentrações de BAP (0; 1; 2; 3 e 4 mg.L⁻¹). O delineamento experimental foi em esquema fatorial 5x2 (5 concentrações e 2 tipos de segmentos) constituído de 10 tratamentos com 4 repetições com 5 tubos em cada repetição, totalizando 200 tubos no experimento.

2.3.2 Efeito das concentrações de sacarose na formação de brotos em segmentos caulinares

Para o experimento II foram utilizados segmento caulinar nodal e o meio de cultura foi suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP e adição de sacarose (0; 1,0; 2,0 e 3,0 g.L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso constituído de 4 tratamento com 4 repetições e 5 tubos em cada repetição, totalizando 80 parcelas experimentais.

2.4 Enraizamento de brotações

Para o enraizamento foram utilizados brotos com 45 dias de cultivo com aproximadamente 1,5 cm provenientes da multiplicação com BAP. Os explantes foram

inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS, solidificado com 0,7% de ágar, na quantidade de 10 mL por tubo, suplementado com 2% de sacarose. O meio de cultura foi complementado com diferentes concentrações de ANA (ácido naftaleno-acético), 0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹. Após 8 dias os explantes foram transferidos para novos meios contendo metade da concentração de sais MS sem a adição da auxina. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso composto de 5 tratamentos com 4 repetições, com 5 tubos por repetição, totalizando 100 tubos no experimento. Foram feitas avaliações em intervalo de 15 dias, quanto ao número e o comprimento de raízes por um período de 60 dias.

Os experimentos em estudo foram conduzidos por meio de método quantitativo, da metodologia científica (Pereira et al., 2018). Os dados obtidos das variáveis observadas, nos diferentes experimentos, foram submetidos à análise de variância com o auxílio do programa estatístico SISVAR 4.3 (Ferreira, 2011). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. O número de brotos, raízes e % de contaminação e germinação foram transformadas pelo Arcoseno $\sqrt{x + 0,5}$ e os dados comprimento de brotos não sofreram transformação.

3. Resultados e Discussão

3.1 Assepsia e germinação de sementes

Para a percentagem de sementes desinfestadas, aos 7 dias de avaliação os resultados da análise de variância demonstraram que houve interação entre os fatores concentração de hipoclorito de sódio e tempo de imersão ($p > 0.05$). O menor porcentual de sementes contaminadas (10%) ocorreu nos tratamentos com 2,0% de hipoclorito de sódio imersas por 15 e 20 min (Tabela 1). No tratamento sem uso do NaOCl, houve 100% de contaminação, indicando com isso, a necessidade de utilização do NaOCl na desinfestação das fontes de explantes. Resultados semelhantes foram encontrados por Amaral (2006) com *Cedrela fisillis*, onde o tratamento de desinfestação de sementes contendo 2,0% de NaOCl durante imersão de 10 minutos, apresentou taxa de contaminação de 7%. Em estudos semelhantes, Souza et al. (2013) notaram que a emprego de hipoclorito de sódio na concentração de 2% por períodos de 10, 15 ou 20 minutos é capaz de eliminar fungos presentes em sementes, principalmente, o de 15 minutos. Esses resultados divergem dos obtidos por Albino et al. (2019), em que para a etapa de desinfestação, a utilização de NaOCl por um período de tempo de 5 minutos foi a mais adequada para a descontaminação e germinação das sementes de *C. estrellensis*.

Foi verificado nesse trabalho que, com o aumento da concentração (2%) e tempo de exposição ao NaOCl (20 min) ocorreu diminuição do número de sementes contaminadas (10%). Entretanto, comprometeu a germinação (30%). O maior valor de germinação (76%) foi alcançado na imersão de 2,0% de hipoclorito por 15 min (Tabela 1).

Tabela 1. Percentagem média de contaminação (7 dias), germinação (15 dias) de sementes de *Cedrela odorata* L. após a inoculação.

Conc.de NaOCl (%)	+ Tempo de imersão (minutos)	Contaminação (%)	Germinação (%)
0	0	100 a	0 h
1,0	10	76 b	10 f
1,0	15	76 b	10 f
1,0	20	70 c	10 f
1,5	10	55 d	38 e
1,5	15	50 e	40 d
1,5	20	46 f	43 c
2,0	10	15 g	70b
2,0	15	10 h	76 a
2,0	20	10 h	30 g

Os valores representam a porcentagem de contaminação e germinação de sementes de *Cedrela odorata* L. submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio associado a diferentes tempos de imersão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Autores.

Marchi & Fernandes (2018) acreditam que o fato de não haver germinação e contaminação por bactéria e fungos na espécie *Adenium sp* submetidos a imersão de 2,0% de hipoclorito por 20 min, pode esta relacionado ao tempo de imersão ou concentração de produto desinfetantes. Nietzsche et al., (2006), afirmam que dependendo do tempo de imersão de desinfetantes pode ocorrer desidratação do explante, comprometendo assim a viabilidade do tecido vegetal.

Nesse sentido é essencial que se determine uma concentração ótima para se obter tecido livre de agentes contaminantes e, conseqüentemente um bom resultado no final do processo de estabelecimento *in vitro*.

Esses resultados mostram que diversos tratamentos têm sido utilizados em espécies florestais para maximizar a germinação das sementes, porém para cada espécie tem exigência e necessidade própria na adoção de protocolo de desinfestação.

3.2 Efeito 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de brotos em segmentos apicais e nodais

Conforme os resultados pode-se observar que ocorreu efeito significativo apenas entre as concentrações de BAP para o número de brotos nos segmentos apicais e nodais, porém para o comprimento dos brotos as diferenças ocorreram apenas nos segmentos apicais (Tabela 2).

Tabela 2 - Número e comprimento médio de brotações em segmentos apicais e nodais de *Cedrella odorata* sob diferentes concentrações de BAP aos 45 dias após a inoculação.

Conc. BAP (mg.L ⁻¹)	Nº brotos		Comprimento de brotos (cm)	
	Apical	Nodal	Apical	Nodal
0	0,55bA	0,45bA	0,50bA	0,74aA
1	1,45aA	1,50aA	1,96aA	0,92aA
2	1,10aA	1,30aA	0,81abA	0,89aA
3	0,80abA	1,05abA	0,70abA	0,56aA
4	0,70abA	1,00abA	0,46bA	0,25aA

Concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na proliferação e comprimento de brotos em segmentos apicais e nodais de *Cedrella odorata* L. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade, letras minúsculas na vertical e letras maiúsculas na horizontal. Fonte: Autores.

Para o parâmetro número de brotos, o resultado significativo superior foi encontrado na concentração de 1mg.L⁻¹ de BAP, que produziu em média de 1,45 e 1,50 brotos/explante, no segmento apical e nodal, respectivamente. Resultado semelhante foi verificado por Albino et al. (2019) onde a utilização de 1 mg L⁻¹ de BAP adicionada ao meio de cultivo foi o mais eficaz para a brotação na etapa de multiplicação *in vitro* de *Cariniana estrellensis*.

Para comprimento das brotações os dois segmentos apresentaram maior desenvolvimento quando submetidos à concentração de 1 mg.L⁻¹ de BAP com comprimento médio de 1,96 cm/explante para o segmento apical e 0,92 cm/explante para o segmento nodal. Superioridade no número de brotos foi observado por Schottz (2007) em segmento

apical de *Swietenia macrophylla*. Esse autor obteve em média até 7,22 brotos/explante quando utilizou 10 mg.L⁻¹ de BAP.

Foi observado que, à medida que se aumentava a concentração de BAP o número e comprimento médio de brotos/explante foram reduzidos, nos segmentos estudados. Esses resultados demonstram para a espécie em estudo, que o uso de BAP em concentrações mais elevadas tende a inibir a formação de brotações e o seu crescimento. Resultados semelhantes foram verificados na espécie arbórea *Cariniana estrellensis*, onde aumento da concentração de BAP adicionado ao meio de cultivo promoveu a diminuição do comprimento das brotações, as menores médias foram observadas em meios com 1,5 e 2 mg L⁻¹ de BAP (Albino et al., 2019).

Neste estudo não houve diferenças entre os segmentos utilizados, contudo os segmentos apicais apresentaram resultados numericamente maiores em relação aos segmentos nodais (Tabela 2). A esse respeito Torres et al. (1998) relataram que gemas apicais normalmente apresentam maior capacidade de crescimento do que gemas axilares, devido ao efeito da dominância apical. Entretanto, é frequente a opção pelo uso de gemas axilares, em função de ocorrerem em maior número por planta. A pequena formação de brotos, tanto em número quanto em comprimento, nos explantes inoculados em meio livre de fitorregulador indica que há necessidade de uma fonte exógena de citocinina para estimular a brotação em segmentos caulinares de *Cedrella odorata* (Figura 1). A esse respeito Botin & Carvalho (2015) notou que dentre as citocininas, o BAP, tem sido intensamente usada na cultura de tecido principalmente para promover a multiplicação celular resultando na indução das gemas adventícias no cultivo *in vitro*.

Figura 1 - Aspecto de formação de brotos em segmento apical de *Cedrella odorata* na concentração de 1 mg. L⁻¹ de BAP aos 60 dias após a inoculação.



Fonte: Autores.

3.3 Efeito de concentrações de sacarose na formação de brotos em segmento caulinar nodal

Aos 45 dias após a inoculação não foi verificada diferenças significativas para o número e comprimento de brotos (Tabela 3). O maior número médio de brotos (2,65/explante) foi obtido nos explantes inoculados no meio de cultura MS, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1,0 g.L⁻¹ de sacarose. Para o comprimento, o maior comprimento foi observado na concentração de 2,0 g.L⁻¹ de sacarose (1,00 cm/explante).

Tabela 3. Número e comprimento de brotações de segmento caulinar nodal de *Cedrella odorata* cultivado em meio MS com 1 mg. L⁻¹ de BAP suplementado com diferentes concentrações de sacarose.

Conc. Sacarose g.L ⁻¹	Nº brotos	Comprimento brotos (cm)
0	0	0
1,0	2,65a	0,87a
2,0	2,05a	1,00a
3,0	1,65a	0,65a

Proliferação e comprimento de brotos em segmento caulinar nodal submetido a meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose. Média seguida de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tucke a 5 % de probabilidade.

Fonte: Autores.

Resultados semelhantes foram verificados em *Cedrela fissilis* que após 30 dias de cultivo foi observado 100% de gemas com brotação em meio MS, suplementado com 2 g.L⁻¹ de sacarose (Amaral, 2006). Estudos com *Theobroma grandiflorum* Schum, mostra que o número de brotos foi favorecido quando se aumentou a teor de sacarose de 1,5 g.L⁻¹ para 3,0 g.L⁻¹ (Ferreira et al., 2002).

Neste estudo os resultados revelam que a variação nas dosagens de sacarose não influenciou no número de brotos e crescimento da parte aérea. Entretanto, a ausência de sacarose no meio de cultura provocou um estado estacionário nos explantes, seguindo-se de necrose e morte dos mesmos após 15 dias de cultivo *in vitro*. Portanto para a espécie em estudo é necessária adição de uma fonte de sacarose para o seu desenvolvimento. O mesmo foi verificado por Reis et al. (2008) em estudo com *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*. Esses autores verificaram que o meio MS adicionado com 3 mg L⁻¹ de BAP na ausência de sacarose, não ocorreu a formação de brotações, indicando que mesmo com a presença de

citocinina, há necessidade de adição de carboidrato ao meio de cultivo para propagação *in vitro* dessa espécie.

3.4 Enraizamento das brotações

De acordo com a análise de variância o número e comprimento médio de raízes foram influenciados pela concentração de ANA presente no meio de cultura e que na ausência da auxina não foi verificado o desenvolvimento de raízes nas brotações (Tabela 4). Para ambas as variáveis, a resposta mais significativa foi obtida com o meio de cultura suplementado com 1mg.L^{-1} de ANA, onde o maior número de raiz foi 2,5 raízes/explante, e o maior comprimento foi de 3,4 cm/explante.

Tabela 4 - Valores médios do número e comprimento de raiz em brotações submetidas a diferentes concentrações de ANA aos 45 dias após a inoculação.

ANA (mg.L^{-1})	Numero de raiz	Comprimento de raiz (cm)
0	0	0
1,0	2,50a	3,40a
1,5	1,50ab	2,60b
2,0	1,20ab	1,80c
2,5	0,50b	0,30d

Diferentes concentrações de ANA na promoção de número e comprimento médio de raiz. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tuckey a 5% de probabilidade.

Fonte: Autores.

Ressalta-se que nas concentrações acima de 1mg.L^{-1} de ANA ocorreu um efeito negativo no desenvolvimento de raízes, com diminuição no número e comprimento das raízes. Esses resultados discordam dos obtidos por Lopes et al. (2001) com a espécie *Switenia macrophylla* e por Laudano (2005) com *Cedrela fissilis* que observaram maiores percentuais de enraizamento quando os explantes nodais foram submetidos as concentrações elevadas ($2,0$ a $5,0\text{mg.L}^{-1}$) de ANA.

A diminuição do numero e comprimento de raízes no processo de micropropagação tem sido relatado que muitas vezes este fato pode ser devido à influência do BAP utilizado na fase de multiplicação que pode estimular a produção de citocininas endógenas (Vankova et

al., 1991) e isso, por sua vez, pode inibir a iniciação da raiz e também o alongamento (Taiz & Zeiger 2004).

Foi observado que as brotações enraizadas apresentaram um bom sistema radicular e um bom desenvolvimento da parte aérea aos 45 dias de cultivo (Figura 2), sendo que as concentrações utilizadas neste trabalho discordam do estudo em *Eucalyptus benthamii* Maiden&Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden, onde a dosagem de 1 mg.L^{-1} de ANA foi observada indução de calo, resultando em efeito negativo no alongamento das brotações (Brondani et al., 2009).

Figura 2 - Brotação de cedro submetida à concentração de 1 mg. L^{-1} de ANA aos 45 dias de cultivo.



Fonte: Autores.

4. Considerações Finais

De acordo com os resultados apresentados o protocolo para o cultivo *in vitro* de cedro e formação de plantas completas conclui-se que: as sementes devem ser desinfestadas com álcool 70% por 1 minuto e imersas por 15 minutos em hipoclorito de sódio a 2 %; o uso de 1 mg L^{-1} de BAP para a indução de brotações é a concentração ótima a ser utilizada no segmento nodal e para o apical além do regulador de crescimento deve ser adicionado ao meio MS 2 g.L^{-1} de sacarose; e para o enraizamento dos brotos a concentração 1 mg.L^{-1} de ANA é suficiente para promover a formação de raízes. Sugere-se pesquisas futuras referentes à taxa de sobrevivência e comportamento agrônômico em ambiente *ex vitro* de plantas de *Cedrella odorata* L. provenientes de cultivo *in vitro*.

Referências

- Albino, B. É. S., Canatto, R. A., Cordeiro, A. T., Fukushima, C. H., Pilon, A. M. (2019). Propagação *in vitro* de jequitibá-branco (*Cariniana estrellensis*): uma alternativa para programas de reflorestamento. *Brazilian Journal of Biosystems Engineering*, 13(2), 88-99. doi: <http://dx.doi.org/10.18011/bioeng2019v13n2p88-99>.
- Amaral, V. F. M. (2006). *Multiplificação in vitro de Cedrella fissilis Vell.* Dissertação Mestrado, Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil.
- Aragão, V. P. M., De Souza, R. Y. R., Reis, R. S., Macedo, A. F., Floh, E. I. S., Silveira, V. (2016). *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. *Plant Cell Tissue and Organ Cult*, 124, 611-620. doi.org/10.1007/s11240-015-0919-8.
- Bianchetti, R. E., DE Resende, C. F., Pacheco, V. S., Dornellas, F. F., DE Oliveira, A. M. S., Freitas, J. C. E., Peixoto, P. H. P. (2017). An improved protocol for *in vitro* propagation of the medicinal plant *Mimosa pudica* L. *African Journal of Biotechnology*, 16(9), 418-428. Doi.org/10.5897/AJB2016.15831.
- Botin, A. A., & Carvalho, A. De (2015). Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais, *Revista de Ciências Agroambientais*, 13(1), 83-96.
- Brondani, G. E., Dutra, L. F., Grossi, F., Wendling, I., Hornig, J. (2009). Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Revista Árvore*, 33(1), 11-19. doi.org/10.1590/S0100-67622009000100002.
- Carvalho, P. E. R. (2010) Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Espécies arbóreas brasileiras. Florestas, 4, 644.
- Carvalho, P. E. R. (1994). Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo, EMBRAPA-CNPQ/SPI, 693.

Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042.

Ferreira, M. G. R., Cárdenas, F. E. N., Carvalho, C. H. S., Carneiro, A. A., Filho, C. F. D. (2002). Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, 24(1), 246-248. doi.org/10.1590/S0100-29452002000100053.

Laudano, W. L. DE S. A. (2005). *Cultura de calos e criopreservação de sementes de Cedrela fissilis Vellozo (Meliaceae)*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.

Lopes, S. C., Lameira, O. A., Fortes, G. R. L., Nogueira, R. C., Pinto, J. E. B. P. (2001). Enraizamento *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King). *Cerne*, Lavras, 7(1), 124-128.

Maestri, M. P., Cardoso, M. G. C. A., Rabelo, L. K. L. A. (2020). A praga do mogno brasileiro: *Hypsipyla grandella* Zeller. *Biodiversidade*, 19(3), 24.

Marchi, R. R. Y., & Fernandes, D. A. (2018). Doses de hipoclorito e tempos de contato no estabelecimento *in vitro* de sementes de rosa do deserto, (*Adenium obesum* Roem. & Schult. (Forssk.)), TCC-Agronomia, Centro Universitário de Várzea Grande – UNIVAG, Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Nietsche, S., Marques, S. V., Pereira, M. C. T., Salles, B., Xavier, A. A., França, A. C., Lima, C., Silva, L. S. (2006). Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. *Ciência Rural*, 36(3), 989-991. doi.org/10.1590/S0103-84782006000300043.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. B. & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica [recurso eletrônico [eBook]]. Santa Maria. Ed. UAB / NTE / UFSM.

Retrieved from https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Reis, I. N. R. de., Lameira, O. A., Cordeiro, I. M. C. C., Carneiro, A. G., Ferreira, S. F. (2008). Indução *in vitro* de brotos em paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*). *Plant Cell Culture and Micropropagation*. Lavras, 4(1), 21-27.

Roussos, P. A., Archimandriti, A., Beldekou, I. (2016). Improving *in vitro* multiplication of juvenile Europe anchestnut (*Castanea sativa* Mill) explants by the use of growthret ardants. *Scientia Horticulturae*, 198, 254-256. doi: 10.1016 / j.scienta.2015.11.039.

Souza, L. M. S., Silva, J. B., Gomes, N. S. B. (2013). Qualidade sanitária e germinação de sementes de copaíba. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 29(1), 1524-1531.

Schottz, E. S., Filho, A. N. K., Tracz, A. L., Koehler, H., Ribas, L. L. F., Quoirin, M. (2007). Multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) a partir de material juvenil. *Ciência Florestal*, 17(2), 109-117. doi.org/10.5902/198050981942.

Sakuragui, C. M., Stefano, M. V., Calazans, L. S. B. (2012) Meliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Recuperado de < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB009998>>.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2004). *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 3, 719.

Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. (1998) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, Brasília- DF: EMBRAPA/CBAB, 1, 509.

Vankova, R., Hsiao, K. C., Bornman, C. H., Gaudinova, A. (1991). Effects of synthetic cytokinins on levels of endogenous cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells suspension. *Journal of Plant Growth Regulation*, 10, 197-199. doi.org/10.1007/BF02279334.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Osmar Alves Lameira – 50%

Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro – 25%

Meiciane Ferreira Campelo – 25%