

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE UNICENTRO  
CAMPUS DE IRATI, PARANÁ**

**ORGANOGENESE *IN VITRO* DE EXPLANTES JUVENIS DE  
*Toona ciliata* var. *australis***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MARINA DE SOUZA ROMANIUK**

**IRATI-PR**

**2021**

**MARINA DE SOUZA ROMANIUK**

**ORGANOGENESE *IN VITRO* DE EXPLANTES JUVENIS DE  
*Toona ciliata* var. *australis***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração em Silvicultura Clonal, para obtenção do título de mestre.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Schmidt Bandeira Peres  
Orientadora

Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi  
Coorientador

IRATI-PR  
2021

Catálogo na Publicação  
Rede de Bibliotecas da Unicentro

R758o

Romaniuk, Marina de Souza

Organogênese in vitro de explantes juvenis de *Toona ciliata* var. *Australis* / Marina de Souza Romaniuk. -- Irati, 2021.  
xi, 65 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração em Silvicultura Clonal, 2021.

Orientadora: Fabiana Schmidt Bandeira Peres

Coorientador: Evandro Vagner Tambarussi

Banca examinadora: Fabiana Schmidt Bandeira Peres, Elisa Cristina Soares de Carvalho, Andréa Dias Koehler, Alexandre Techy de Almeida Garrett

Bibliografia

1. Calogênese. 2. Thidiazuron. 3. 6-benzilaminopurina. I. Título.  
II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais.

CDD 634.9



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE/UNICENTRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS - PPGF**

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Defesa Nº 156

**Marina de Souza Romaniuk**

**“ORGANOGENESE *in vitro* DE EXPLANTES JUVENIS DE *Toona ciliata* var. *australis*”**

Dissertação aprovada em 27/05/2021, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração em Manejo Sustentável de Recursos Florestais, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela seguinte Banca Examinadora:

Dra. Elisa Cristina Soares de Carvalho  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo  
Primeira Examinadora

Dra. Andréa Dias Koehler  
Universidade Federal de Viçosa  
Segunda Examinadora

Dr. Alexandre Techy de Almeida Garrett  
Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Terceiro Examinador

Dra. Fabiana Schmidt Bandeira Peres  
Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Irati - PR  
2021

Home Page: <http://www.unicentro.br>

**Campus Santa Cruz:** Rua Salvatore Renna – Padre Salvador, 875, Bairro Santa Cruz – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090  
CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR

**Campus Cedeteg:** Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, 838, Bairro Vila Carli – Fone: (42) 3629-8100 – CEP 85.040-167 – GUARAPUAVA – PR

**Campus de Irati:** Rua Professora Maria Roza Zanon de Almeida, Bairro Engenheiro Gutierrez – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000  
CEP 84.505-677 – IRATI – PR

Dedico a Deus por estar presente em todo tempo.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por proporcionar este tempo de estudo e reflexão, inspirando e cuidando em todos os momentos.

Ao meu marido Guilherme, pelo amor, cuidado, paciência, consolo e apoio durante o período de estudo.

Aos meus pais Paulo e Liana pelo amor, incentivo, apoio e consolo durante toda a carreira acadêmica, me ensinando e orientando o caminho por qual seguir.

A minha irmã Deborah, meus sobrinhos Miguel e Rafaela pelo apoio, brincadeiras, descontrações e compreensão pela minha ausência em momentos importantes.

A professora Fabiana por ter aceitado me orientar, pela sua dedicação e atenção, disponibilidade e ensino que foram cruciais ao meu desenvolvimento pessoal e profissional, atuando como alicerce para minha carreira futura.

Ao professor Evandro, pela coorientação e incentivo, pelos conhecimentos repassados e amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais UNICENTRO, Campus Irati, pelos ensinamentos ao longo desse período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível- CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Aos meus colegas Daniela, Isabel, Alexandre, Karoline pela ajuda prestada no desenvolvimento desta pesquisa.

A professora Daniele pelo incentivo e apoio durante o desenvolvimento desta pesquisa.

A Karina R., Karina D., Brenda, Ana, pela amizade e conselhos.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa, muito obrigada!

*“Portanto, se alguém está em Cristo, é nova criação. As coisas antigas já passaram; eis que surgiram coisas novas!”*

*2 Coríntios 5.17 (NVI)*

## Lista de Abreviaturas

(diH)Z: diidrozeatina

2,4-D: ácido 2,4-diclofenoxiacético

6-BA: 6-benziladenina

AIA: ácido 3-indolacético

AIB ou IBA: ácido indolbutírico

ANA ou NAA: ácido naftalenoacético

Atm: pressão atmosférica

BAP: 6-benzilaminopurina

CKX: citocinina oxidase

GA<sub>3</sub>: giberelina

HCl: ácido clorídrico

iP: isopenteniladenina

IUPAC: União internacional da Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

KIN: Cinetina, 6-furfurilaminopurina

L: Litro

Mg: miligrama

MS: Murashige e Skoog (1962)

NaOH: hidróxido de sódio

pH: potencial hidrogeniônico

PVP: polivinilpirrolidona

TDZ: thidiazuron, 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia

t-Z: transzeatina

WPM: Wood Plant Medium (Lloyd e Mc Cown, 1981)

Zeatina: N-(4-hidroxi-3metilbut-2-enil) aminopurina



Sumário	
<b>Sumário</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>10</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Cedro Australiano (<i>Toona ciliata</i> M. Roem. var. <i>australis</i>)</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Micropropagação</b> .....	<b>13</b>
2.1. Organogênese .....	15
2.2. Organogênese em <i>Toona ciliata</i> .....	16
2.3. Tipos de explantes utilizados na indução de organogênese de espécies lenhosas	17
2.4. Biorreguladores no meio de cultivo .....	18
<b>Objetivos</b> .....	<b>21</b>
Objetivo geral .....	21
Objetivos específicos .....	21
<b>Capítulo I. Organogênese <i>in vitro</i> de explantes juvenis de <i>Toona ciliata</i> var. <i>australis</i> sob efeito de biorreguladores vegetais</b> .....	<b>22</b>
1.1. Introdução .....	23
1.2. Material e métodos .....	25
1.2.1. Local do experimento .....	25
1.2.2. Material vegetal .....	25
1.2.2.1. Germinação <i>in vitro</i> .....	25
1.2.2.2. Subcultivo .....	25
1.2.2.3. Explantes .....	26
1.2.3. Meio de cultivo o experimento com TDZ .....	27
1.2.4. Meio de cultivo para o experimento com BAP .....	27
1.2.5. Delineamento experimental para o experimento com TDZ .....	28
1.2.6. Delineamento experimental para o experimento com BAP .....	28
1.2.7. Avaliações experimentais .....	28
1.2.7.1. Calogênese .....	28
1.2.7.2. Organogênese .....	30
1.2.8. Análise estatística .....	30
1.3. Resultados .....	30
1.3.1. Comportamento dos explantes .....	30
1.3.2. Calogênese .....	33
1.3.3. Organogênese .....	38
1.4. Discussões .....	41
1.5. Conclusões .....	46

<b>Capítulo II. Multiplicação de brotos aéreos de <i>Toona ciliata</i> var. <i>australis</i> regenerados via organogênese <i>in vitro</i> .....</b>	<b>47</b>
2.1. Introdução .....	47
2.2. Material e Métodos .....	48
2.2.1. Local do experimento.....	48
2.2.2. Material vegetal.....	49
2.2.3. Meio de cultivo para multiplicação de brotos .....	49
2.2.4. Aclimação.....	50
2.2.5. Delineamento experimental e análise de dados.....	51
2.3. Resultados.....	52
2.4. Discussões.....	55
2.5. Conclusões .....	58
Referências bibliográficas.....	59

## Resumo Geral

O Cedro Australiano (*Toona ciliata* M. Roem. var. *australis*) é uma espécie da família das meliáceas com grande potencial econômico e ambiental pois possui rápido crescimento e possui resistência à broca dos cedros (*Hypsipyla grandella* Zeller), além de produzir metabólitos secundários amplamente utilizados na medicina em tratamentos de doenças como o diabetes, artrite, depressão e o câncer. No entanto, um fator limitante para o emprego da espécie é a sua propagação de forma seminal visto a complexidade da colheita e a curta viabilidade das sementes, sendo a micropropagação uma alternativa para propagação da espécie. Dessa forma, o presente estudo avaliou a morfogênese de explantes juvenis de cedro australiano cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e benzilaminopurina (BAP), bem como a multiplicação dos brotos regenerados. Foram instalados dois experimentos independentes utilizando como material vegetal para ambos experimentos explantes de segmento de caule, folha e raiz, sendo cultivados em meio MS com diferentes concentrações de TDZ (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>), primeiro experimento e de BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>), segundo experimento. Em ambos os experimentos se avaliou a organogênese, contabilizando o percentual de explantes regenerados e a taxa de multiplicação, contabilizando quantos brotos se formaram em um único explante e a calogênese, considerando as características da oxidação, textura, cor, intensidade e região dos calos formados. Foram realizados três subcultivos sucessivos das brotações obtidas em meio MS+ 0,3 mg. L<sup>-1</sup> BAP+ 0,01 mg. L<sup>-1</sup> ANA. Posteriormente, as plantas foram transplantadas para frascos contendo substrato Agrinobre<sup>®</sup>, sendo, no transplântio, realizada a biometria. O cultivo em meio com diferentes concentrações de TDZ induziu a regeneração em 43,8% dos segmentos de segmento de caule sob a concentração de 0,25 mg. L<sup>-1</sup>. Houve formação de calos em 94,4% dos explantes de segmento de caule, destes 85,5% foram formados em concentração 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ, com predominância de calos de textura semi-compacta e coloração branca. A concentração 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ teve a maior formação de calos friáveis. Quanto ao experimento com BAP houve regeneração em 95% de explantes de segmento de caule, cultivados em meio com concentração 0,5 mg. L<sup>-1</sup>. Aos 90 dias de cultivo, o maior número de brotações por explante foi na concentração 0,1 mg. L<sup>-1</sup> BAP com taxa de multiplicação 1,66. As brotações com 180 dias tiveram maior crescimento em altura (56,8 mm) e percentual de enraizamento (34,14%) na concentração 0,5 mg. L<sup>-1</sup> BAP. Aos 240 dias as brotações formadas em 1,0 mg. L<sup>-1</sup> BAP apresentaram maior crescimento em altura total, com 142,0 mm e percentual

de enraizamento de 63,15%. A utilização de BAP e TDZ na organogênese de explantes juvenis de *T. ciliata* proporcionou avanço quanto aos efeitos dos biorreguladores e as respostas morfológicas de cada explante demonstrando quais são mais propícios para propagação dessa espécie, além de servir como linha para futuras pesquisas.

**Palavras-chave:** Calogênese, Thidiazuron, 6-benzilaminopurina

### **Abstract**

The Australian Red Cedar (*Toona ciliata* M. Roem. var. *australis*) is a species of the Meliaceae family with great economic and environmental potential since it has fast growth, reaching up to 30 meters in height and resistance to the cedar borer (*Hypsipyla grandella* Zeller), besides producing secondary metabolites widely used in medicine in treatments for diseases such as diabetes, arthritis, depression, and cancer. However, a limiting factor is its seminal propagation since the complexity of harvesting and the short viability of seeds, being the micropropagation an alternative to propagate the species. The aim of this study was to evaluate the morphogenesis of juvenile explants of Australian cedar cultivated in culture medium with different concentrations of TDZ and BAP, and the multiplication of the regenerated organs. Two independent experiments were carried out, one with culture medium constituted by TDZ and the other by BAP, using as plant material for both experiments hypocotyl, leaf and root explants, being cultivated in MS medium with different concentrations of TDZ (0.0, 0.25, 0.5 and 1.0 mg. L<sup>-1</sup>) and BAP (0.0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg. L<sup>-1</sup>). In both experiments direct organogenesis was evaluated, counting the percentage of regenerated explants and multiplication rate, counting how many sprouts were formed on a single explant and indirect organogenesis, were considered the characteristics of oxidation, texture, color, intensity and region of the formed callus. The sprouts were subcultivated three times in MS medium + 0.3 mg. L<sup>-1</sup> BAP + 0.01 mg. L<sup>-1</sup> ANA and later transplanted twice in Agrinobre® substrate, performing at transplanting the biometry evaluations.. Cultivation in medium with different concentrations of TDZ induced regeneration in 43.8% of the hypocotyl segments under the concentration of 0.25 mg. L<sup>-1</sup> TDZ. There was indirect organogenesis in 94.4% of the hypocotyl explants, of these 85.5% were at concentration of 1.0 mg. L<sup>-1</sup> TDZ, with a predominance of semi-compact texture and white coloration. The concentration 0.5 mg. L<sup>-1</sup> TDZ had the greatest formation of friable callus. Considering the experiment with BAP was observed direct organogenesis in 95% of explants from hypocotyl, cultivated

in medium with a concentration of 0.5 mg. L<sup>-1</sup>. At 90 days of culture, the greatest number of sprouts per explant was in the 0.1 mg. L<sup>-1</sup> BAP with a multiplication rate of 1.66. The sprouts at 180 days had the greatest height growth (56.8 mm) and rooting percentage (34.14%) in the concentration 0.5 mg. L<sup>-1</sup> BAP. At 240 days the sprouts formed in 1.0 mg. L<sup>-1</sup> BAP developed greater growth in total height with 142.0 mm and rooting percentage of 63.15%. The utilization of BAP and TDZ in the organogenesis of juvenile explants of *T. ciliata* provided advance regarding the effects of bioregulators and the morphological responses of each explant, demonstrating which are more propitious for the propagation of this species, besides serving as a line for future researches.

**Keywords:** Callogenesis, Thidiazuron, 6-benzylaminopurine

## Introdução

### 1. Cedro Australiano (*Toona ciliata* M. Roem. var. *australis*)

O cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem. var. *australis*) pertence à família Meliaceae – uma família com mais de 50 gêneros compreendendo mais de 1.000 espécies. A espécie também é conhecida como cedro do Himalaia e mogno da China (Kalil Filho e Wendling, 2012; Chiruvella et al., 2014). Distribuiu-se naturalmente nos países do sul da Ásia, norte da Austrália e Himalaia (Daquinta et al., 2005; Liao et al., 2017; Zhan et al., 2019).

A espécie foi introduzida no Brasil em 1973 pela empresa Aracruz Florestal: Aracruz Celulose, localizada no estado do Espírito Santo, fazendo, em primeiro momento, parte de um banco de germoplasma. Somente em 1989 as sementes foram distribuídas aos agricultores e pesquisadores para plantios. No estado de Minas Gerais, o cedro australiano tem sido uma alternativa ao reflorestamento, onde a madeira oriunda dos plantios de pinus (*Pinus spp.*) e eucalipto (*Eucalyptus spp.*) não atendem toda a demanda do comércio (Kalil Filho e Wendling, 2012).

É uma planta caducifólia com frutificação entre os meses de janeiro e março. Pode atingir 20,0 até 35,0 m de altura, com tronco ereto e cilíndrico, cerne avermelhado e de rápido crescimento, possui folhas compostas paripenadas e lanceoladas, flores de cor creme ou branca e frutos em forma de cápsulas lenhosas elipsoides (Kalil Filho e Wendling, 2012; Rojas- Rodríguez e Torres- Córdoba, 2014).

As sementes frescas de cedro australiano não apresentam dormência e podem apresentar taxa de germinação entre 70 a 90%. A germinação pode ocorrer entre 7 e 21 dias após a sementeira (Kalil Filho e Wendling, 2012). A espécie mostra rápida germinação com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas, tendo taxa de germinação de 90,52%, nessas condições (Lucchese e Lazarotto et al., 2018). Entretanto, as sementes de *T. ciliata* podem apresentar rápida perda de viabilidade, resultando em menores taxas de germinação quando armazenadas (Frank et al., 2009).

Quanto à produção de mudas, esta pode ocorrer por meio da propagação de sementes e por métodos assexuados como enxertia e estaquia, contudo há uma demanda de produção de mudas com alta qualidade e otimização de custos nos tratamentos silviculturais, sendo a propagação clonal mais desejada nesse aspecto, pois, garante a homogeneidade das plantas e dos tratamentos silviculturais (Daquinta et al., 2003, 2005).

O principal fator limitante ao plantio de meliáceas na região da América Central e América do Sul é sua baixa resistência a broca do mogno (*Hypsipyla grandella* Zeller)

(Daquinta et al., 2003), lagartas especializadas em ataques a subfamília Swietenioideae, como exemplo o cedro (*Cedrela spp.*) e mogno (*Swietenia macrophylla* King) danificam todos os órgãos vegetais, desde mudas até as plantas adultas em qualquer época do ano, tornando o plantio comercial inviável (Lemes et al., 2019; Hilje, 2020; Maestri et al., 2020). O cedro australiano por sua vez mostrou possuir resistência a essa praga (Hilje, 2020).

Acredita-se que a *T. ciliata* possua metabólitos secundários que agem como antibiótico a *H. grandella* (Daquinta et al., 2005, 2007; Hilje, 2020). Entretanto a espécie é suscetível ao ataque de *Cryptotermes brevis* Walker. (Kalotermitidae), sendo indicado seu plantio consorciado com outras espécies agrícolas ou florestais (Oliveira e Paes, 2019).

As plantas de *T. ciliata* são sensíveis ao estresse hídrico e podem desenvolver anormalidade sob estresse salino (Lucchese e Bovolini et al., 2018). No entanto, mesmo sob condições de estresse hídrico e salino podem apresentar pequena recuperação, com início de rebrota, indicando que podem se adaptar sob tais condições (Andrade et al., 2020). Outro potencial dessa espécie se dá em resistência ao frio, apresentando baixa mortalidade devido á geadas quando consorciado com pinus (Navroski et al., 2017).

O cedro australiano é caracterizado por possuir madeira de alta qualidade e pode demonstrar crescimento favorável em reflorestamento (Kundal et al., 2020), tem mostrado grande potencial para utilização comercial na produção de móveis e perfumaria (Zhan et al., 2019), além de possuir constituintes orgânicos com ampla utilização na medicina como no desenvolvimento de hipoglicemiantes, antioxidantes e agentes antiglicantes (Rana et al., 2016; Beseni et al., 2019), nos tratamentos de artrite (Gou et al., 2017), de distúrbios depressivos (Duan et al., 2015), antimalárica e anti-inflamatório (Leo et al., 2018) e no tratamento de câncer como leucemia, câncer de mama, carcinoma hepático e câncer de boca e faringe (Zhang et al., 2012).

## 2. Micropropagação

A micropropagação ou cultura de tecidos é uma área da biotecnologia muito utilizada e de grande impacto na agricultura, pois permite a multiplicação de plantas em um tempo reduzido, possibilitando a produção de plantas com características agrônomicas superiores (Rocha e Quoirin, 2004; Ulisses et al., 2010; Aragão et al., 2016).

Essa técnica de propagação vegetativa consiste no cultivo de órgãos e tecidos vegetais em ambiente asséptico, com objetivo de regenerar novas plantas a partir do

explante vegetal (Buchanan et al., 2015). São utilizadas partes de plantas denominadas como explantes, podendo ser segmentos de caule, folha, raiz, sementes, entre outros (George et al., 2008).

As células dos explantes são induzidas a se diferenciarem e se tornarem competentes e determinadas a uma função diferente, pré-estabelecida na planta, contudo no desenvolvimento normal, essa função não se expressa (Torres et al., 1998). A indução para a diferenciação, ocorre por meio da ação de biorreguladores no cultivo, que são compostos exógenos à planta, mas com ação semelhante aos hormônios vegetais (Kerbaui, 2008).

O sucesso da micropropagação depende da espécie, da concentração de biorreguladores, da composição do meio nutritivo, dos tamanhos e tipos de explantes e das condições de cultivo (Tambosi e Rogge-renner, 2010).

A micropropagação constitui-se por três sistemas de multiplicação (Figura 1), a proliferação de gemas axilares, embriogênese somática e organogênese. O sistema de multiplicação por proliferação de gemas axilares consiste na inoculação de órgãos meristemáticos em meios de cultivo, sendo posteriormente induzidos a formar novos órgãos. A embriogênese somática compreende a indução de células totipotentes, formando uma estrutura bipolar, com desenvolvimento semelhante ao embrião zigótico, não tendo ligação vascular com o explante matriz (Torres et al., 1998; Novikova e Zaytseva, 2018).

A organogênese é um processo pelo qual ocorre a formação de estrutura unipolar no explante, resultando na formação de brotos ou raízes adventícias com ligação vascular com o explante matriz, a formação de novos órgãos ocorre em lugares diferentes daqueles onde são originados naturalmente, podendo a sua indução ocorrer de maneira direta ou indireta, ou seja, com a formação ou não de calos (Torres et al., 1998).



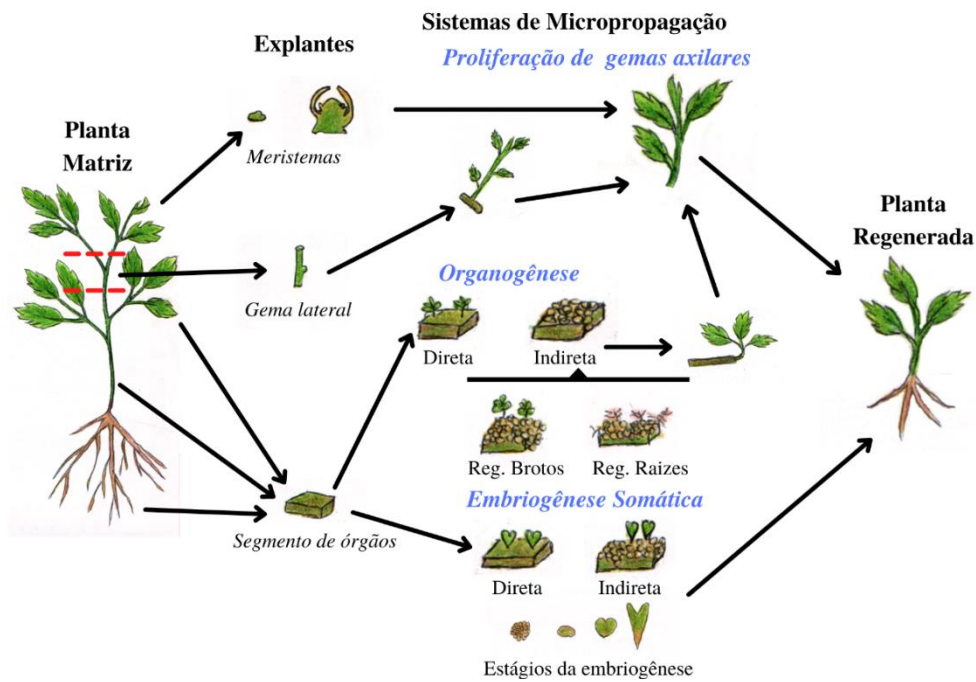


Figura 1. Sistemas de micropropagação. Adaptado de George et. al. (2008), arte da autora.

## 2.1. Organogênese

A organogênese é um processo em que ocorre a formação de novos órgãos em locais diferentes da ocorrência natural da planta. O processo compreende a divisão e expansão celular no local onde serão formados novos órgãos, local denominado como meristema, regiões especializadas onde são produzidas novas células que se diferenciam à medida em que se afastam do meristema (Buchanan et al., 2015).

Existem três estádios para a indução da organogênese após um corte no explante vegetal, sendo o primeiro deles o envio de sinais para estimular o processo de regeneração no local do corte, seguido pelo acúmulo de biorreguladores na região, que consequentemente lideram ao último estádio que é a diferenciação celular (Bidabadi e Jain, 2020).

O sistema de organogênese pode ser induzido de duas maneiras, inerentes à espécie em questão e também aos biorreguladores que são adicionados ao meio de cultivo *in vitro*, procedendo de forma direta e indireta (Landa et al, 2000).

A organogênese direta compreende a formação direta de brotações em tecidos com potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que normalmente, não expressam essa característica. Esses tecidos podem ser câmbio vascular, base do pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas, segmentos de

raízes, entre outros, enquanto a calogênese corresponde ao processo de regeneração da planta precedido pelo desenvolvimento de calos (Torres et al., 1998).

O processo da calogênese é caracterizado pela formação de um tecido de cicatrização no local onde ocorreu a incisão no explante e conseqüentemente o crescimento e desenvolvimento de células desorganizadas, conhecidas como calo, sem diferenciação de órgãos (Neumann et al., 2009).

Os calos possuem células com atividade de divisão celular, podendo se diferenciar e formar novas células competentes, prosseguindo com a sua determinação a um desenvolvimento geneticamente programado, formando novos órgãos e se desenvolvendo em um clone da planta original (Rocha e Quoirin, 2004).

Os calos formados são classificados de acordo com a capacidade de regeneração de órgão ou tecido, os que aparentemente não apresentam regeneração de órgão ou tecidos são chamados de friáveis ou compactos, caracterizados por serem grandes e com células vacuoladas altamente diferenciadas ou compactos, característicos pela dureza e com pequenas regiões meristemáticas (Ikeuchi et al., 2013; Smith, 2013).

Outros calos que apresentam algum grau de regeneração são denominados calo enraizado, com gema adventícia ou calo embrionário, de acordo com o órgão que se tornará. No entanto, os calos formados podem variar em tamanho, forma, coloração e expressão genética (Ikeuchi et al., 2013).

Um fator importante para a indução e desenvolvimento de calogênese é o uso de biorreguladores em meio de cultivo, no entanto, o tipo e a concentração ideal tem ampla variação entre espécies e até entre genótipos da mesma espécie e condições nutricionais (Smith, 2013).

## 2.2. Organogênese em *Toona ciliata*

Poucos autores estudaram a organogênese em cedro australiano, sendo estudos relacionados aos meios de cultivo e regeneração de explantes oriundos de plantas matrizes, com idade superior a um ano.

Mroginski et al. (2003), estudaram a regeneração *in vitro* de *T. ciliata*, a partir de propágulos obtidos de plantas de dois anos de idade e de origem seminal. Os autores objetivaram descrever um protocolo de micropropagação testando dois explantes, gemas apicais dormentes e segmentos nodais com uma única gema lateral. Os autores relatam que aproximadamente 10% dos explantes apicais e 40% dos explantes nodais com uma gema lateral se desenvolveram, entre 1 e 2 semanas depois de serem inoculados, contudo

a regeneração de novos brotos foi baixa, sendo 2% em explantes apicais e 22% em explantes nodais com uma gema lateral.

Daquinta et al. (2007), estudaram a regeneração de explantes de *T. ciliata*, obtidos de plantas entre 2 e 3 anos de idade, a partir da cultura de segmentos de ráquis e concluíram que houve maior formação de calo nos meios MS acrescidos com 0,25 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ.

Liao et al. (2017), avaliaram meios de cultivo para propagação *in vitro* de *T. ciliata*. Os autores utilizaram segmentos da folha como explantes e concluíram que o melhor meio para propagação foi o WPM com 6-BA 0,5 mg. L<sup>-1</sup> + IBA 0,05 mg. L<sup>-1</sup>. O melhor meio de cultura para induzir o enraizamento foi ½ MS+ IBA 0,05 mg. L<sup>-1</sup> +NAA 0,5 mg. L<sup>-1</sup>, obtendo 100% de enraizamento.

### 2.3. Tipos de explantes utilizados na indução de organogênese de espécies lenhosas

A cultura de tecidos é iniciada a partir de pequenos fragmentos da planta matriz, chamados de explantes. A escolha do tamanho e do tipo do explante depende do sistema de micropropagação que será realizado, do tipo de meio de cultivo que será utilizado e da espécie que será propagada (George et al., 2008).

A planta matriz da qual serão obtidos os explantes, deve ser uma planta bem nutrida, sem sintomas de doença ou deficiência nutricional. A fase de crescimento que ela se encontra, também define os protocolos adotados no cultivo *in vitro*, sendo preferíveis brotações novas originadas no período de crescimento ativo da planta (Torres et al., 1998).

O potencial de regeneração *in vitro* é influenciado pelo genótipo do explante da planta em questão. Para muitas espécies é possível localizar em mapas genéticos *locus* responsáveis pela resposta ao cultivo *in vitro* (Sugiyama, 2000). Os explantes mais indicados para a micropropagação são os que têm maior capacidade de demonstrar pluripotência como ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados (Torres et al., 1998).

Os explantes possuem determinação para o crescimento vegetal, e uma vez fornecida condições que satisfaçam as necessidades nutricionais, podem se desenvolver e originar novas plantas. Explantes em meios de cultivo são sensíveis às condições ambientais, sendo geralmente deixados em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (George et al., 2008).

Dentre os explantes utilizados em estudos de micropropagação de *T. ciliata*, Daquinta et al. (2003), utilizaram folhas jovens e ráquis das folhas para indução da calogênese, enquanto Song et al. (2020) utilizaram cotilédones para calogênese e nós cotiledonares para regeneração de brotações.

A região de origem dos explantes pode influenciar na resposta morfogênica pois diferentes partes de uma planta respondem a diferentes concentrações de um mesmo biorregulador (Fagan et al., 2015), outro fator compreende a juvenilidade dos explantes, isto é, explantes mais jovens tendem a responder a estímulos do meio com maior intensidade do que explantes mais velhos (Hartmann et al., 2014).

#### 2.4. Biorreguladores no meio de cultivo

A escolha da utilização de biorreguladores em meio de cultivo depende da composição de sais do meio e da espécie que será propagada. O emprego usual dessas substâncias se dá com o propósito de regular os estádios I e II da micropropagação (George et al., 2008).

Os estádios de micropropagação englobam o estabelecimento e a indução dos explantes no meio de cultivo, objetivando a formação de brotações estáveis e a multiplicação dessas brotações e posterior enraizamento. Os biorreguladores além de induzirem um nível básico de crescimento, possuem o papel de direcionar respostas de desenvolvimento na organogênese (Hartmann et al., 2014), são compostos sintéticos com ação semelhante aos hormônios naturais das plantas como ácido indolbutírico (AIB), 6-benzilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenida (2-iP) thidiazuron (TDZ). Dentre eles, os mais utilizados em cultura de tecidos pertencem ao grupo de citocininas e auxinas (Kerbaui, 2008; Bassegio et al, 2017).

O grupo das citocininas é considerado como hormônio essencial às plantas, pois estão relacionados direta e indiretamente a diversos estádios fisiológicos como divisão, crescimento e diferenciação celular, retardamento da senescência foliar, germinação de sementes, formação de gemas caulinares e outros processos (Kerbaui, 2008).

Estudos demonstram que as citocininas regulam a transição das fases da citocinese, sendo que na transição da fase G1→S, essa classe hormonal é responsável por induzir a expressão de 3 genes ciclinas tipo-D, os quais controlam o ciclo, favorecendo o ciclo celular mitótico sobre a endo-reduplicação (Nisler, 2018). A aplicação de citocininas em meios de cultivo proporciona a quebra da dominância apical estimulando

o crescimento das gemas axilares em meios de cultivo e influenciando inclusive o crescimento de gemas adjacentes às gemas axilares (Buchanan, 2015).

Dentre as citocininas naturais as mais conhecidas são isopenteniladenina (2iP), trans-zeatina (t-Z), diidrozeatina ((diH)Z). Algumas citocininas sintéticas, aquelas que possuem ação similar às citocininas naturais são cinetina (KIN), 6-benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), sendo as duas primeiras constituídas por um anel de purina e a última, uma citocinina da classe das feniluréias (Botin e Carvalho, 2015; Buchanan et al., 2015).

Entre as citocininas aromáticas que são altamente ativas nas plantas, contudo, menos abundantes, estão os derivados metoxi de N<sup>6</sup>-benzyladenina. O BAP ou 6-BA (6-benzilaminopurina, 6-benziladenina, IUPAC: N-benzyl-7H-purin-6-amine) é um biorregulador da primeira geração de compostos sintéticos que promovem o crescimento e desenvolvimento de plantas (Buchanan et al., 2015; Arias et al., 2019), é um composto sintético capaz de promover a formação de calos e formação de gemas axilares (Foo et al., 2018; Arias et al., 2019).

Dentre outras ações fisiológicas na planta, o BAP pode promover a transição de fase juvenil para adulta em bulbos de *Lilium X formolongi* (Ishimori et al., 2007) além de inibir o crescimento de raízes (Auer, 1996). Esse biorregulador possui anel purínico em sua composição e peso molecular de 225,25 g.mol<sup>-1</sup> (Silva, 2012; Buchanan et al., 2015; National Center for Biotechnology Information, 2021).

O efeito de sinalização do BAP em células do mesófilo de *Triticum aestivum* L. demonstrou que este pode controlar a pigmentação fotossintética, a concentração de peróxido de hidrogênio, regular a atividade de enzimas antioxidantes como dismutase do superóxido, peroxidase de ascorbato e catalase (Musiienko et al., 2014).

O thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea) é um composto enquadrado no grupo das citocininas cujo propósito tem sido substituir a feniluréia. Apresenta uma coloração amarelo claro cristalino, com solubilidade moderada em água e solubilidade diversificada em solventes orgânicos como acetonas, benzenos, sendo altamente solúvel em etanol (Murthy et al., 1998).

A utilização de TDZ em estudos de morfogênese vegetal *in vitro* demonstram que baixas concentrações (2,20 mg. L<sup>-1</sup>) possuem alta atividade, sendo necessário curtos períodos de exposição do explante ao composto o suficiente para estimular a regeneração da planta, induzindo a formação de gemas axilares ou brotações adventícias pelo mecanismo de quebra da dominância do meristema apical (Murthy et al., 1998).

O thidiazuron (TDZ) pode induzir a formação de calos, além de ser utilizado como um potente regulador de crescimento, exibindo efeitos de hormônios endógenos dos grupos citocininas, auxinas, giberelinas e etileno (Ahmad e Faisal, 2018; Pai e Desai, 2018). Possui peso molecular de 220,25 g. mol<sup>-1</sup> e sua estrutura é composta por grupos funcionais fenil e tiadizol, ambos necessários para atividade biológica (Dewir et al., 2018; Nisler, 2018).

O TDZ é capaz de atuar antagonicamente ou sinergicamente com outros hormônios vegetais (como ácido abscísico, etileno, melatonina e serotonina), regulando os níveis para cima ou para baixo, e regulando o fluxo de cátions específicos como o cálcio (Dinani et al., 2018).

Comparado a outros reguladores de crescimento em situação de cultura de tecidos, o TDZ pode ser utilizado para regeneração vegetal em concentrações 10 até 1000 vezes menores que outros biorreguladores, valorando-o no comércio de agroquímicos (Dinani et al., 2018).

O forte efeito do TDZ, pode ser associado a capacidade de ativação de receptores da citocinina e pela resistência à degradação pela citocinina oxidase (CKX), quando comparado às demais citocininas, dando a essa classe de compostos sintéticos à base de ureia efeitos mais fortes que as citocininas endógenas (Nisler, 2018).

Baixas concentrações de TDZ podem estimular o hábito de crescimento ortotrópico e estimular o crescimento de gemas axilares em cultivo *in vitro* de espécies recalcitrantes com maior eficiência em comparação com as citocininas amino purínicas, esse efeito pode estar associado ao TDZ preencher requisitos tanto de citocininas quanto de auxinas (Novikova e Zaytseva, 2018).

Considerando o exposto, propõe-se neste trabalho avaliar tipos de explantes juvenis e testar diferentes tipos de biorreguladores no meio de cultivo objetivando acrescentar o conhecimento sobre a espécie para os campos de silvicultura e propagação clonal.

## **Objetivos**

### Objetivo geral

Contribuir no desenvolvimento de um protocolo de regeneração *in vitro* de Cedro Australiano (*Toona ciliata* M. Roem) avaliando-se a viabilidade do uso de explantes juvenis na organogênese *in vitro* de cultivados em presença de diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

.

### Objetivos específicos

- Verificar a resposta morfogênica de explantes juvenis de *T. ciliata* cultivados em meios com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>);
- Avaliar o potencial organogênico de explantes juvenis de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de BAP;
- Avaliar as taxas de multiplicação *in vitro* de gemas adventícias de *T. ciliata* regeneradas via organogênese quando submetidas a diferentes concentrações de BAP.

## **Capítulo I. Organogênese *in vitro* de explantes juvenis de *Toona ciliata* var. australis sob efeito de biorreguladores vegetais**

### Resumo

O cedro australiano é uma espécie lenhosa da família das meliaceae com grande potencial para as indústrias madeireira e farmacêutica por apresentar madeira de alta qualidade, crescimento favorável em plantios consorciados e reflorestamento e pela produção de compostos orgânicos amplamente utilizados na medicina. No entanto existem limitações na sua propagação seminal ocasionadas pela altura dos indivíduos tornando complexa a coleta de sementes e a baixa viabilidade destas. Formas de propagação clonal, como a micropropagação são alternativas para essas limitações, favorecendo a multiplicação em maior escala e menor tempo, além de utilizar outros propágulos da planta. Nesse sentido, propôs-se neste estudo induzir a organogênese de explantes juvenis de cedro australiano cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de TDZ e BAP. Das plantas com 135 e 165 dias de cedro australiano foram empregados explantes de folha, segmento de caule e raiz e inoculado em meio MS acrescido com diferentes concentrações de TDZ (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>) e BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>). Avaliou-se a organogênese verificando o percentual de regeneração e a calogênese verificando o percentual de calejamento e as características dos calos formados. Houve organogênese indireta em explantes de segmento de caule cultivados em meio com concentrações 0,25, 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ, apresentando taxas de regeneração de 43,8%, 15,8% e 10,5% respectivamente, houve calogênese em 85,5% dos explantes de segmento de caule e raiz cultivados em meio com concentração de 1,0 mg. L<sup>-1</sup> TDZ. Houve formação de calos em 1,6% dos explantes de segmento de caule em concentrações 0,5 e 1,0 (mg. L<sup>-1</sup>). Houve 95%, 85% e 80% de regeneração de brotos aéreos em segmentos de caule nas concentrações de 0,5, 1,0 e 0,1 mg. L<sup>-1</sup> BAP. No presente estudo foi demonstrado que segmentos de caule possuem relevância para organogênese, acrescentando informações para a espécie e sobre o efeito do biorreguladores na organogênese.



## 1.1. Introdução

O cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem.) (Meliaceae) é uma espécie florestal com distribuição natural nos países sul Asiático, norte da Austrália e Himalaia. Embora seja uma espécie exótica no Brasil, foi introduzida no país em 1973, visto seu potencial de crescimento em reflorestamento e sua produção de madeira de alta qualidade (Kalil Filho e Wendling, 2012). Essa espécie possui substâncias orgânicas com significante citotoxicidade a células cancerígenas e ampla utilização medicinal (Daquinta et al., 2005; Kalil filho e Wendling, 2012; Liao et al., 2017; Zhan et al., 2019), além de resistência a *Hypsipyla grandella* Zeller, praga especializada em ataques a monocultivos da sub família *Swietenioideae*, representada por mogno (*Swietenia macrophylla* King) e cedros (*Cedrela spp.*) (Oliveira e Paes, 2019; Hilje, 2020).

No entanto, a propagação seminal da espécie é limitada por fatores intrínsecos, como a rápida perda de viabilidade das sementes após a coleta (Daquinta et al., 2005), dificuldade da coleta dos frutos pela altura da copa das árvores, uma vez que estas podem atingir até 35,0 metros (Kalil filho e Wendling, 2012), além da heterogeneidade no desenvolvimento das plantas (Daquinta et al, 2003).

Em virtude disso, técnicas de propagação clonal tornam-se interessantes para a produção de mudas de cedro australiano (Daquinta et al.,2007). A micropropagação é uma técnica de clonagem amplamente utilizada na biotecnologia, permitindo a multiplicação de segmentos de órgãos vegetais em tempo e espaço reduzidos, tornando-a mais eficiente, nesse quesito, em comparação a outras técnicas de propagação vegetativa (Rocha e Quoirin, 2004; Ulisses et al., 2010; Aragão et al., 2016).

Dentre os sistemas de micropropagação, há a multiplicação por organogênese, técnica baseada no processo natural de regeneração de plantas, quando submetidas a condições estimulantes como lesões em órgãos e estresse (Taiz e Zeiger, 2017). Essa técnica é utilizada com o intuito de propagar plantas superiores objetivando seleção de progênies, transformação genética, extração de metabólitos secundários entre outros (Buchanan, 2015).

O sistema de propagação por organogênese ocorre pela regeneração *De novo*, onde a regeneração é consequente da aquisição de competência de uma célula sob efeito de sinais de biorreguladores ou do ambiente, estabelecendo um centro meristemóide e induzindo a formação de um novo órgão (Sang et al., 2018).

Na organogênese há a possibilidade de formação de brotos diretamente sobre o explante de origem, ou ainda da formação de calos e posteriormente, nos calos pode

ocorrer a formação de brotações adventícias. Tal resposta sobre a formação de brotos é influenciada pela classe de biorregulador utilizada em meio de cultivo, orientação do explante inoculado, da fonte de propágulos e estágio de desenvolvimento do explante e danos mecânicos no tecido vegetal (Buchanan et al., 2015; Hou et al., 2020).

Quanto aos biorreguladores que influenciam na organogênese, as citocininas como o TDZ e o BAP são reguladoras do crescimento vegetal envolvidas na especificação de células embrionárias, no mantimento de células meristemáticas, na formação de brotações e no desenvolvimento do câmbio vascular e, são relacionadas positivamente com a regeneração *De novo* (Choi et al., 2011).

Uma vez iniciada a organogênese, o desenvolvimento das gemas adventícias, formando brotos, podem vir por dois caminhos distintos, a organogênese direta, onde ocorre formação de brotos diretamente no segmento vegetal, sem estágio de calo, e a calogênese, em que há formação de células parenquimáticas com atividade de divisão celular, os calos, podendo posteriormente formar brotações sobre os calos (Torres et al., 1998; Rocha e Quoirin, 2004).

Quanto a organogênese em cedro australiano pode-se citar os estudos conduzidos por Song et al (2020) cujo objetivo deu-se na avaliação da organogênese em resposta a fatores como idade, genótipo e método de inoculação de explantes em meio de cultivo com biorreguladores; Mroginski et al. (2003) e Li et al. (2019) que avaliaram a regeneração adventícia de diferentes tipos de explantes e biorreguladores em meio de cultivo; Liao et al. (2017), que testou diferentes meios de cultivo para a propagação da espécie e Daquinta et al (2003, 2005, 2007) que observaram a regeneração adventícia de explantes de ráquis sob efeito de TDZ e a regeneração de segmentos vegetais cultivados em meio com BAP e AIB (Mroginski et al., 2003).

Com a finalidade de agregar conhecimento acerca da espécie devido a limitada disponibilidade de informações acerca da técnica de organogênese *in vitro* em *T. ciliata*, objetivou-se no presente experimento observar a resposta morfogênica de explantes juvenis de segmentos de caule, folhas e raízes de *T. Ciliata* cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de TDZ e BAP, verificando o potencial da espécie na indução de organogênese e caracterizando morfológicamente os calos formados.

## 1.2. Material e métodos

### 1.2.1. Local do experimento

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Silvicultura, e de Biotecnologia Florestal, lotados no Departamento de Engenharia Florestal e no Centro Integrado de Pesquisas de Biomassa, Biotecnologia e Bioenergia, respectivamente, ambos na Universidade Estadual do Centro-Oeste, em Irati, Paraná.

### 1.2.2. Material vegetal

Utilizou-se explantes obtidos de plantas de *Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* provenientes de germinação *in vitro*, com 135 (para o experimento com BAP) e 165 dias (para o experimento com TDZ) de idade. As sementes utilizadas foram adquiridas de um lote comercial (Arbocenter®), com procedência de área de coleta de sementes em Birigui - São Paulo (21° 15' 11,94" S e 50° 19' 52,79" O), da safra de 2019.

#### 1.2.2.1. Germinação *in vitro*

Inicialmente as sementes foram desinfestadas em capela de fluxo laminar em solução de álcool 70% (v/v) por um minuto, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio (1%), acrescido de três gotas do surfactante Tween20® para cada 100 mL de solução, durante 15 minutos. Posteriormente foram realizados três enxágues em água deionizada autoclavada e as sementes inoculadas em meio de cultivo contendo sais básicos e vitaminas de Murashige e Skoog (1962) acrescido de sacarose (30,0 g. L<sup>-1</sup>); mio Inositol (100 mg. L<sup>-1</sup>); GA<sub>3</sub> (1,5 mg. L<sup>-1</sup>) e ágar Vetec® (6 g. L<sup>-1</sup>) com pH ajustado para 5,7 (± 0,01), utilizando-se soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L<sup>-1</sup> e ácido clorídrico (HCl) 1 mol. L<sup>-1</sup>.

As sementes inoculadas foram mantidas em sala de crescimento a 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e oito horas de escuro, e intensidade luminosa de 27 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtida por lâmpadas brancas de *led*, tipo luz do dia, até ocorrer a protrusão da radícula e emergência dos cotilédones.

#### 1.2.2.2. Subcultivo

Depois de 45 dias, em que as plântulas atingiram altura aproximada de brotação aérea de cinco centímetros, realizou-se o subcultivo das mesmas, em meio de cultivo contendo sais básicos e vitaminas MS + sacarose (30 g. L<sup>-1</sup>) + mio-inositol (100 mg. L<sup>-1</sup>)

+ BAP (0,3 mg. L<sup>-1</sup>) + ANA (0,01 mg. L<sup>-1</sup>), destacando a radícula formada no meio de multiplicação, sendo mantidas por 30 dias nas mesmas condições ambientais da sala de crescimento, citadas anteriormente. Os subcultivos das plantas foram realizados a cada 30 dias. Em todos os subcultivos as plantas foram cultivadas em meio de cultivo fresco com a mesma composição anteriormente descrita.

### 1.2.2.3. Explantes

Dessas plantas, com 135 e 165 dias de idade, foram utilizados como explantes (Figura 1 A), segmentos de folhas (aproximadamente 1,0 a 1,5 cm de comprimento) (Figura 1 B), de segmento de caule (aproximadamente 0,5 a 10,0 mm de comprimento) (Figura 1 C) e de raízes (aproximadamente 0,5 a 10,0 mm de comprimento) (Figura 1 D).

Em capela de fluxo laminar, em condições de assepsia, e com o auxílio de pinça e bisturi, os explantes foram excisados e inoculados nos meios de cultivo com diferentes concentrações dos biorreguladores utilizados nos experimentos um e dois, contendo BAP e TDZ. Para o explante segmento de folha, estes foram depositados com a face abaxial em contato com o meio de cultivo, e os segmentos de segmento de caule e raiz depositados horizontalmente no meio.

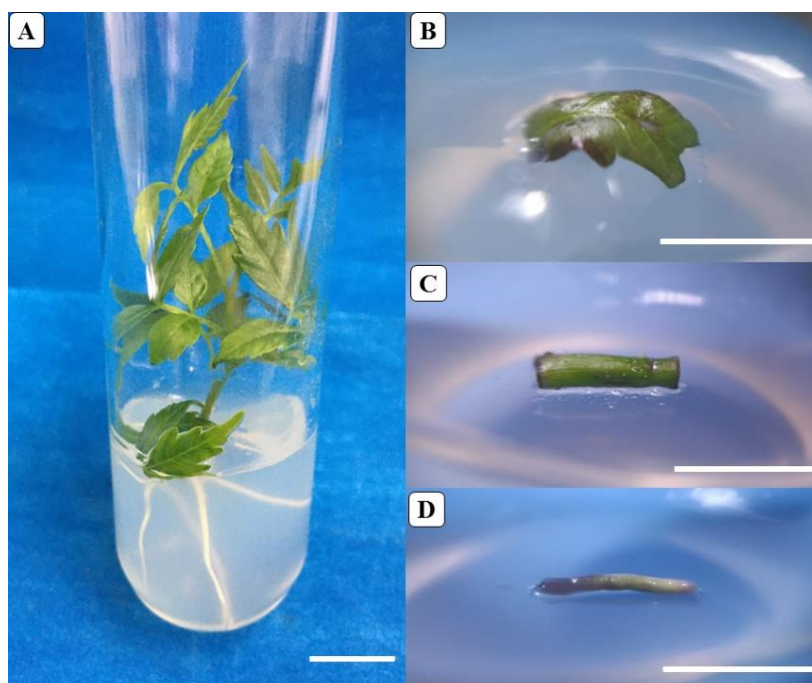


Figura 1. Explantes de *T. ciliata* utilizados neste experimento. (A) Planta de *T. ciliata*; (B) Explante confeccionado a partir de segmento de folha; (C) Explante confeccionado a partir de segmento de caule; (D) Explante confeccionado a partir de segmento de raiz. Barras horizontais representam 1 cm.

### 1.2.3. Meio de cultivo o experimento com TDZ

Utilizou-se meio de cultivo constituído pelos sais básicos e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de sacarose (30,0 g. L<sup>-1</sup>); mio Inositol (100 mg. L<sup>-1</sup>) e ágar Vetec® (6 g. L<sup>-1</sup>), acrescentou-se também quatro diferentes concentrações de TDZ (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>), sendo esses os respectivos tratamentos. Após o preparo, o pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , utilizando-se soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L<sup>-1</sup> e de ácido clorídrico (HCl) 1 mol L<sup>-1</sup>.

O ágar foi fundido em forno de micro-ondas e adicionado ao meio após o ajuste do pH, prosseguindo para a distribuição do meio em tubos de ensaio (150 x 25 mm), sendo vertidos 10 mL de meio de cultivo em cada tubo de ensaio, os quais foram vedados com tampa de polipropileno. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 120°C e 1,5 atm. de pressão, por 20 minutos.

Posteriormente à inoculação dos explantes nos meios de cultivo, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento durante 30 dias a 25 °C  $\pm 1$  °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e oito horas de escuro, e intensidade luminosa de 27  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtida por lâmpadas brancas de *led*, tipo luz do dia.

A cada 30 dias de cultivo, realizou-se o subcultivo dos explantes que tiveram resposta morfogênica, sendo os explantes que formaram calos, subcultivados em meio fresco de mesma concentração dos tratamentos experimentais, isto é, em meio com diferentes concentrações de TDZ (0,25; 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>), e os explantes que formaram brotos, foram subcultivados em meio MS + 0,3 mg. L<sup>-1</sup> BAP+ 0,01 mg. L<sup>-1</sup> ANA, sendo a brotação excisada do explante de origem, descartando o explante de origem.

### 1.2.4. Meio de cultivo para o experimento com BAP

O meio de cultivo utilizado constituiu-se pelos sais básicos e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de sacarose (30,0 g. L<sup>-1</sup>); mio Inositol (100 mg. L<sup>-1</sup>) e ágar Vetec® (6 g. L<sup>-1</sup>), dividido em quatro concentrações de BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>). Após o preparo, o pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , utilizando-se soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L<sup>-1</sup> e de ácido clorídrico (HCl) 1 mol L<sup>-1</sup>.

O ágar foi fundido em forno de micro-ondas e adicionado ao meio após o ajuste do pH, prosseguindo para a distribuição do meio em tubos de ensaio (150 x 25 mm), sendo vertidos 10 mL de meio de cultivo em cada tubo de ensaio, os quais foram vedados

com tampa de polipropileno. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C e 1,5 atm. de pressão, por 20 minutos.

Posteriormente à inoculação dos explantes nos meios de cultivo, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento a 25 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e oito horas de escuro, e intensidade luminosa de 27  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtida por lâmpadas brancas de *led*, tipo luz do dia.

Após completarem 30 e 60 dias, as brotações aéreas obtidas foram repicadas para novo meios de cultivo, descartando as raízes adventícias formadas, constituído por sais básicos de MS acrescido de sacarose (30,0 g. L<sup>-1</sup>); mio Inositol (100 mg. L<sup>-1</sup>), ANA (0,01 mg. L<sup>-1</sup>), BAP (0,3 mg. L<sup>-1</sup>) e ágar Vetec® (6 g. L<sup>-1</sup>), sendo mantidos nas mesmas condições ambientais supracitadas.

#### 1.2.5. Delineamento experimental para o experimento com TDZ

Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, com quatro tubos de ensaio para cada repetição, totalizando 240 tubos de ensaio. Foi inoculado um explante por tubo de ensaio, totalizando 240 unidades experimentais. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (3x4), em que os fatores foram constituídos por três tipos de explantes: (a) segmentos de folha, (b) segmentos de segmento de caule e (c) segmentos de raiz; e quatro concentrações de TDZ, em mg. L<sup>-1</sup>: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0.

#### 1.2.6. Delineamento experimental para o experimento com BAP

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (3x4), em que os fatores foram constituídos por três tipos de explantes: (a) segmento de folha, (b) segmento de segmento de caule e (c) segmento de raiz; e quatro concentrações de BAP, em mg. L<sup>-1</sup>: 0,0; 0,1; 0,5; 1,0. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, com quatro tubos de ensaio para cada repetição, totalizando 240 tubos de ensaio, sendo inoculados um explante por tubo de ensaio, totalizando 240 unidades experimentais.

#### 1.2.7. Avaliações experimentais

##### 1.2.7.1. Calogênese

As avaliações foram realizadas aos 30 e 60 dias de cultivo após a inoculação dos explantes em meio de cultivo. Para respostas morfogênicas de calogênese, ou seja a

formação de calos, seguiu-se os critérios de avaliação qualitativa proposta por Alves et al. (2004), sendo atribuídas notas às respostas morfogênicas dos explantes (Figura 2). As respostas morfogênicas da calogênese foram esquematizadas nos seguintes quesitos:

a) Intensidade de calejamento (Figura 2 A), onde observou-se a quantidade de calos formados na superfície do explante, atribuindo valores para baixa, média e alta intensidade;

b) Grau de oxidação do explante (Figura 2 B), onde avaliou-se a cor do explante, atribuindo-se valores para explantes que não mudaram de cor, ou seja, continuaram verdes e valores para o escurecimento, relacionando-se com a oxidação;

c) Textura do calo (Figura 2 C), diferenciando-os pelas características de agregação celular dos calos, sendo textura compacta- calos com aspecto enrijecido, textura friável- calos com aspecto farelento, textura semi-compacta- calos com maior presença de textura friável do que compacta, textura semi-friável- calos com maior presença de textura compacta do que friável;

d) Coloração dos calos (Figura 2 D), caracterizando as cores dos calos formados, sendo branco, verde claro, bege e marrom;

e) Região de calejamento no explante de origem (Figura 2 E), observando o local do explante onde houve a formação do calo, sendo diferenciados os calos que formaram nas extremidades do explante, ou seja, nos locais de incisão e em todo explante.

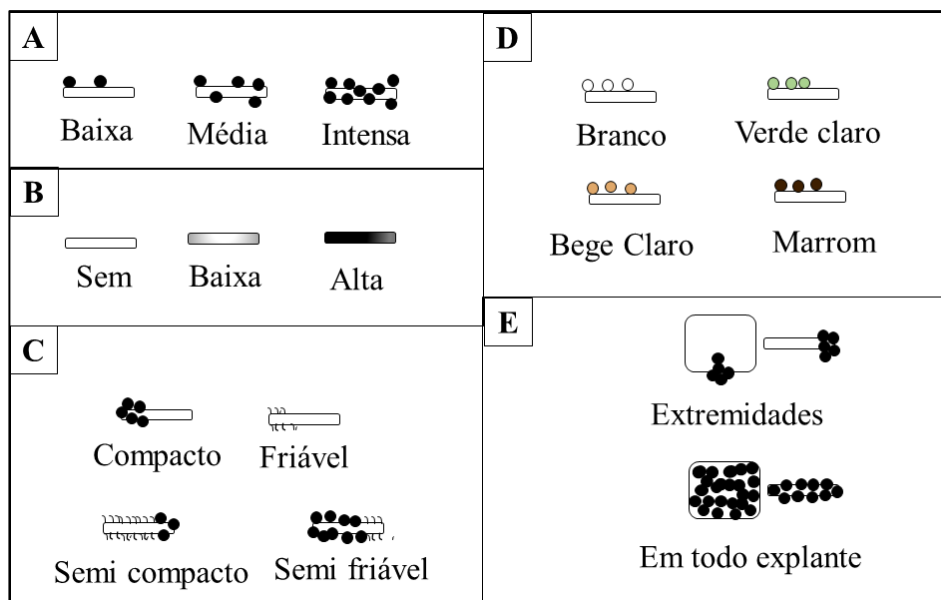


Figura 2. Esquematização da avaliação qualitativa dos calos obtidos no experimento. (A) Intensidade de calejamento; (B) Grau de oxidação do explante; (C) Textura do calo; (D) Coloração do calo; (E) Região do calejamento no explante de origem.

#### 1.2.7.2. Organogênese

Quanto a organogênese direta avaliou-se aos 30 e 60 dias as brotações formadas nos explantes, verificando-se a taxa de regeneração, ou seja, a capacidade do explante em regenerar uma nova planta, a partir dos dados de número de brotações formadas por explante, e do número de folíolos por brotações.

Considerou-se também a região de regeneração, sendo avaliadas as brotações que se formaram nas extremidades dos explantes, ou seja, nos locais onde ocorreu a incisão, e também por todo o explante, sendo consideradas as brotações em locais onde não haviam incisões como as faces superior e inferior do explante.

#### 1.2.8. Análise estatística

Os dados obtidos nestas avaliações não atenderam aos pressupostos da ANOVA, sendo utilizado nesse estudo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação de médias a 5% de probabilidade de erro. Realizou-se a análise de regressão e ajuste dos parâmetros para os dados. As análises estatísticas foram realizadas no *software* Action (Equipe Estatcamp, 2014).

### 1.3. Resultados

#### 1.3.1. Comportamento dos explantes

Neste estudo utilizou-se plantas multiplicadas *in vitro* pelo fato de estudos preliminares não apresentarem sucesso na germinação. Inicialmente será relatado os resultados obtidos em relação a resposta dos explantes aos meios de cultivo contendo diferentes concentrações de TDZ e BAP.

Sobre a oxidação em explantes tratados com o TDZ (Figura 3 A), observou-se menor oxidação em segmentos de raiz, seguido por segmentos de segmento de caule e, em explantes tratados com BAP (Figura 3 B) observou-se menor oxidação em explantes de caule e raiz. Os segmentos de folha cultivados em ambos biorreguladores começaram a oxidar aproximadamente sete dias após a inoculação em meio de cultivo, e após 30 dias após a incubação 90% dos explantes já estavam com oxidação intensa.



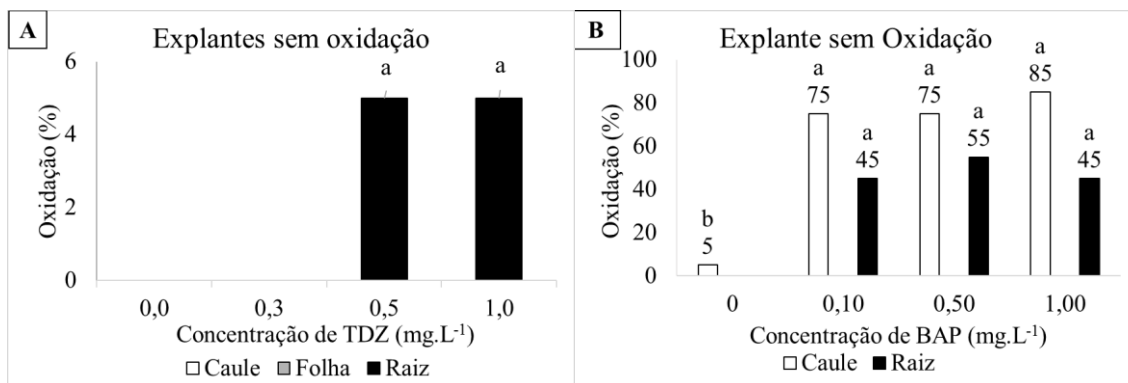


Figura 3. Percentual de oxidação de explantes de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ e BAP (mg. L<sup>-1</sup>). (A) Explantes cultivados em meio com TDZ (mg. L<sup>-1</sup>); (B) Explantes cultivados em meio com BAP (mg. L<sup>-1</sup>). Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si.

Sobre as respostas morfogênicas houve calogênese e organogênese indireta em explantes cultivados em meio com TDZ e organogênese direta em explantes cultivados em meio com BAP. Os detalhes sobre a calogênese e organogênese são relatados nos próximos tópicos.

Quanto a região de calejamento em explantes cultivados em meio com TDZ, o maior percentual (30%) ocorreu nas extremidades (Figuras 4 A, 5 A) em explantes de segmento de caule cultivados na concentração de 0,25 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ, seguido por 25% nesse mesmo tipo de explante na concentração de 0,50 mg. L<sup>-1</sup> e 22,5 % em todo explante (Figuras 4 B, 5 B) de segmento de caule cultivados em meio com concentração de 1,00 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ.

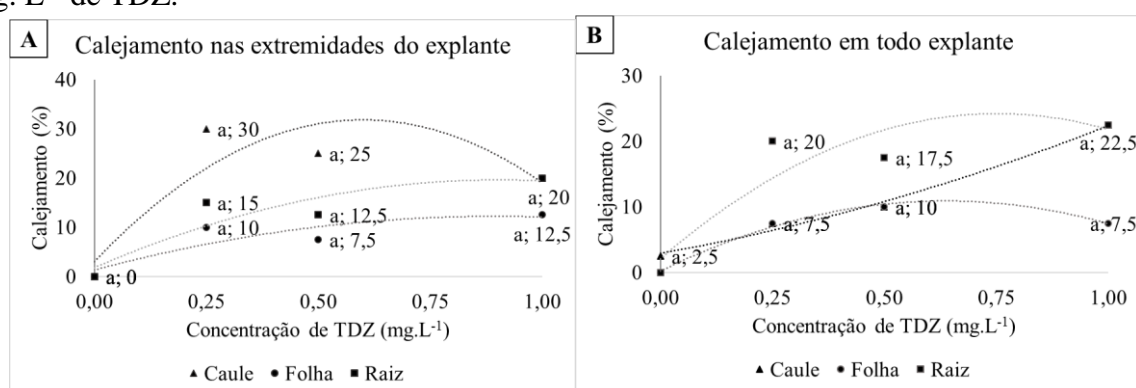


Figura 4. Região de calejamento de explantes de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). (A) Calejamento nas extremidades do explante; (B) Calejamento em todo explante. Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente.

Para o segmento de folha a maior percentagem de calejamento (12,5%) ocorreu nas extremidades do explante, na concentração 1,0 mg. L<sup>-1</sup>, seguido por 10% em todo o

explante na concentração de 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ. Considerando os explantes de raiz, o maior percentual de calejamento na extremidade do explante foi na concentração de 1,0 mg. L<sup>-1</sup>.

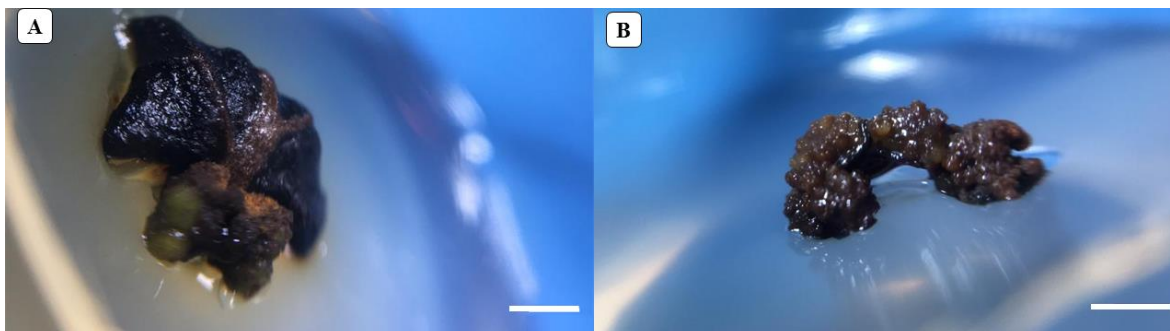


Figura 5. Região de calejamento em explantes de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). (A) Calejamento na extremidade do explante de folha; (B) Calejamento em todo explante de raiz. As barras horizontais representam 25 mm.

Quanto a região de regeneração, pode-se observar tendências de resposta em relação a concentração de BAP, tendo o maior percentual de regeneração nas extremidades dos explantes cultivados nas concentrações mais baixas, isto é, 0,1 e 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP (Figuras 6 A, 7 A). Quanto a regeneração em todo o explante, observa-se que houve aumento conforme aumentou a concentração de BAP (Figuras 6 B, 7 B).

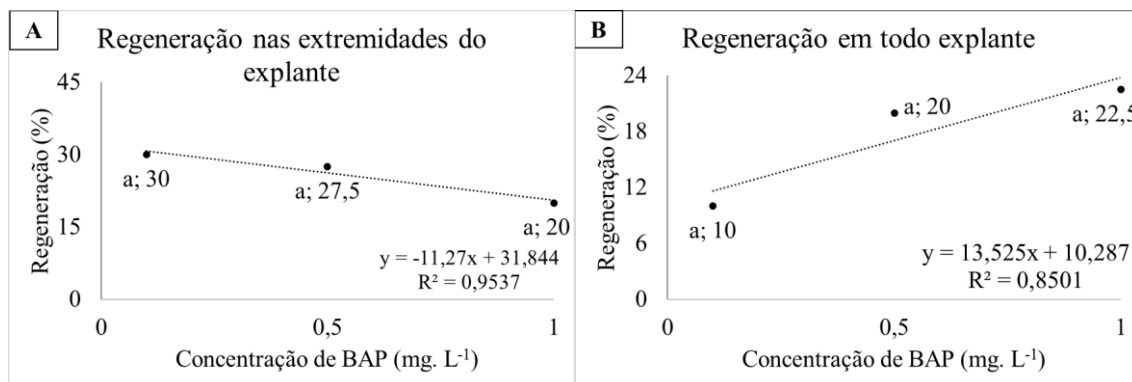


Figura 6. Região de regeneração de brotos em explantes de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de BAP (mg. L<sup>-1</sup>). (A) Regeneração ocorrida nas extremidades do explante; (B) Regeneração em todo explante. Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Medias não diferiram significativamente.

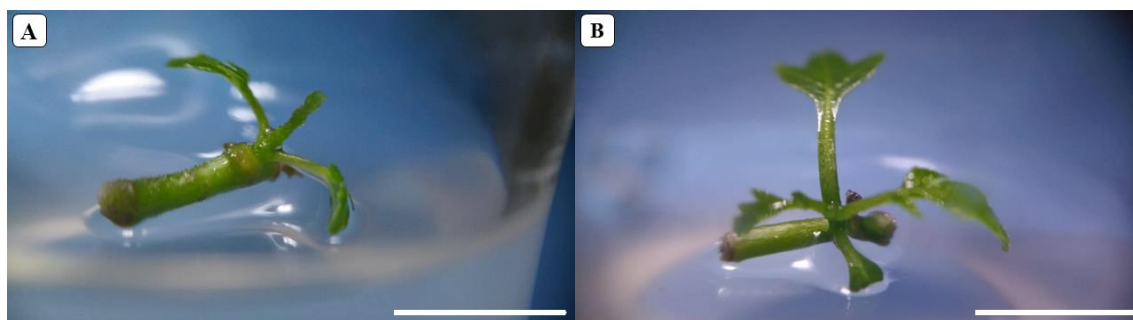


Figura 7. Regeneração de explantes de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de BAP ( $\text{mg. L}^{-1}$ ). (A) Regeneração ocorrida nas extremidades do explante; (B) Regeneração em todo explante. Barras horizontais representam 1 cm.

### 1.3.2. Calogênese

A calogênese nos explantes mostrou-se relacionado ao aumento da concentração de TDZ aplicada no meio de cultivo (Figura 8). A concentração de  $0,0 \text{ mg. L}^{-1}$  induziu pouca formação de calos, ocorrendo somente em 5% de explantes de segmento de caule. O maior percentual de formação de calos, 85%, deu-se nos explantes de segmento de caule e raiz sob concentração de  $1,0 \text{ mg. L}^{-1}$  de TDZ.

No experimento utilizando BAP em diferentes concentrações no meio de cultivo observou-se baixa calogênese havendo presença de calos somente em 1,6% dos explantes de segmentos de caule nas concentrações 0,5 e  $1,0 \text{ (mg. L}^{-1})$ . Dos calos formados, a textura predominante era friável em baixa intensidade, sem presença de nódulos, com coloração branca e se estendendo na extremidade do explante.

As concentrações ótimas de TDZ para obter formação máxima de calos em explantes juvenis de *T. ciliata*, obtidas por meio da regressão de dados no presente estudo, se encontram em  $0,74 \text{ mg. L}^{-1}$  para segmentos de folha,  $0,78 \text{ mg. L}^{-1}$  para segmentos de raiz e  $0,76 \text{ mg. L}^{-1}$  para segmentos do segmento de caule (Figura 8).

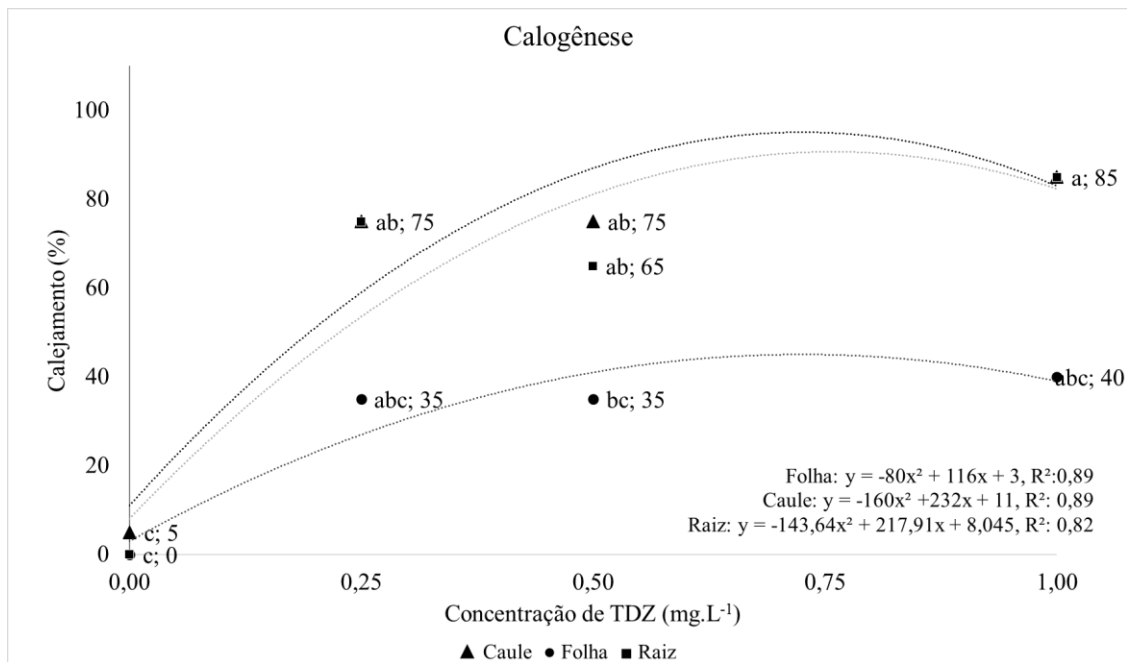


Figura 8. Percentual de calejamento de explantes de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra, não diferem significativamente.

Dentre os calos formados a concentração cuja apresentou muitos calos por explante, com alta intensidade de calogênese se deu na concentração de 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ em segmentos de segmento de caule, com 40% de calejamento (Figura 9). Nesse tipo de explante, observou-se que a intensidade de calejamento aumenta conforme aumenta a concentração de TDZ. A intensidade de calejamento média, teve maior percentual na concentração de 0,25 mg. L<sup>-1</sup> em explante de segmento de caule.

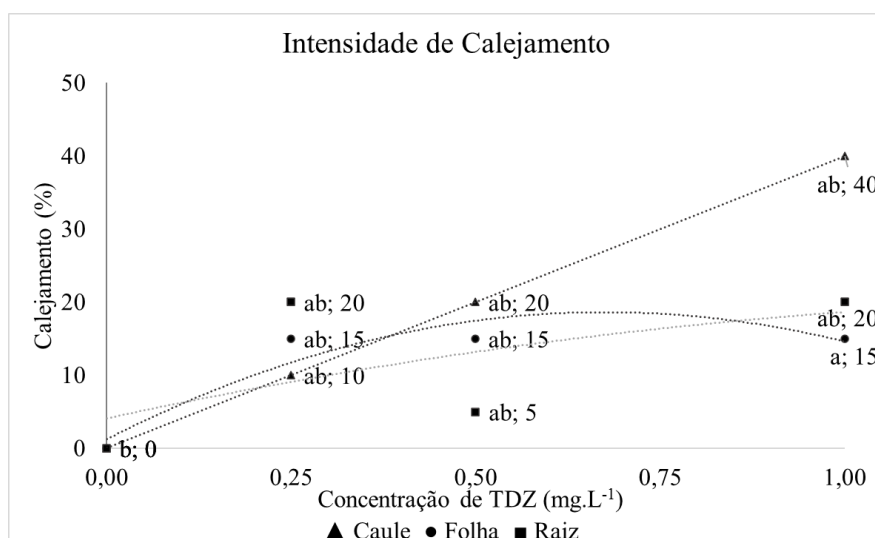


Figura 9. Intensidade de calejamento em explantes de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). Teste de comparações múltiplas de Kruskal-

Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si.

Sobre a textura dos calos formados, houve predominância de calos compactos (Figuras 10 A, 11 A), compreendendo cerca de 90% dos calos formados durante este estudo, seguido por semi-compacto (Figuras 10 C, 11 C), cuja característica é a formação conjunta de textura friável e pouca presença de textura compacta, compondo cerca de 30% dos calos formados. Para ambas as texturas, compacto e semi-compacto houve o aumento da formação dessas categorias de textura com o aumento da concentração do biorregulador.

Houve predominância de formação de calos de textura friável em explantes do segmento de caule e folha (Figuras 10 B, 11 B), representando 15% dos calos formados e mostraram ter formação máxima na concentração de  $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$  de TDZ. A concentração ótima calculada a partir de regressão, para obter formação de calos de textura friável em segmentos de segmento de caule é de  $0,58 \text{ mg. L}^{-1}$  e de  $0,51 \text{ mg. L}^{-1}$  de TDZ para segmentos de folha.

A textura semi-friável (Figuras 10 D, 11 D), cuja característica é a formação conjunta de maior predominância de textura compacta e menor de textura friável, não apresentou diferença significativa entre as concentrações e tipos de explantes, compondo cerca de 10% dos calos formados nesse estudo.

Quanto a coloração dos calos formados (Figuras 12 e 13), a mais frequente foi a marrom (Figuras 12 D, 13 D), relacionada com calos de textura compacta e semi-friável, estando presente em 80% dos calos formados, em sua maioria em explantes de raízes.

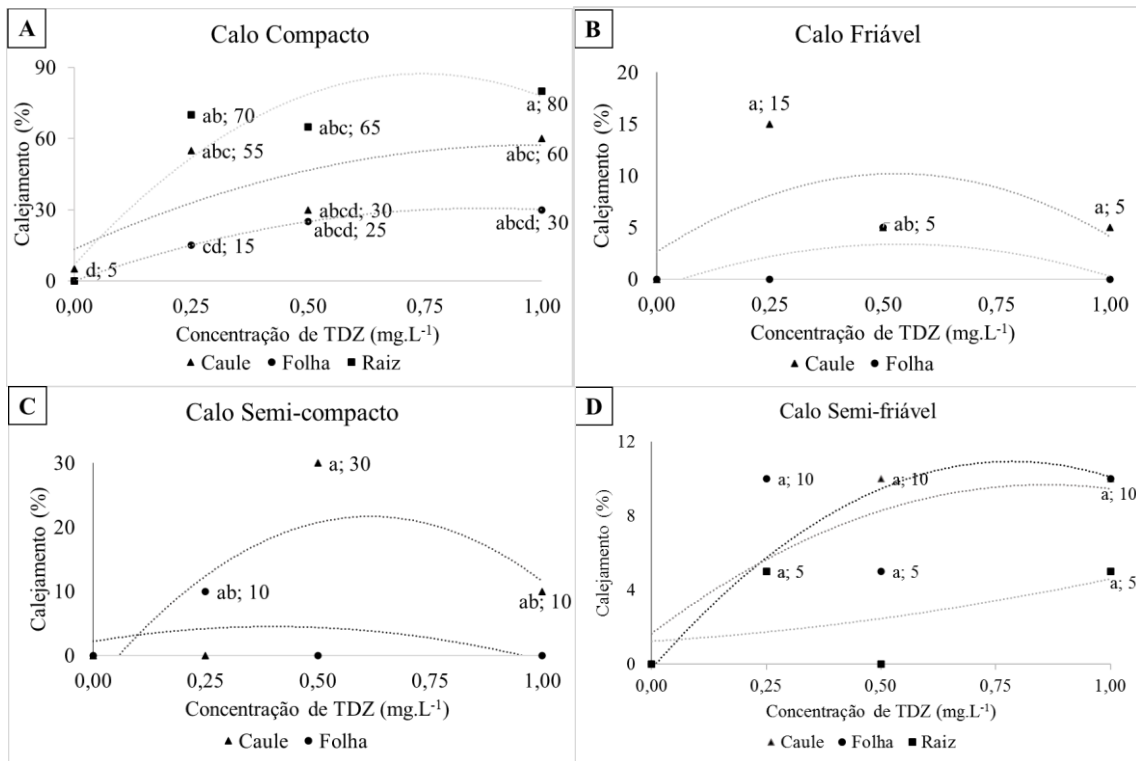


Figura 10. Textura dos calos formados em explantes de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). (A) Calo compacto; (B) Calo friável; (C) Calo semi-compacto; (D) Calo semi-friável. Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente.

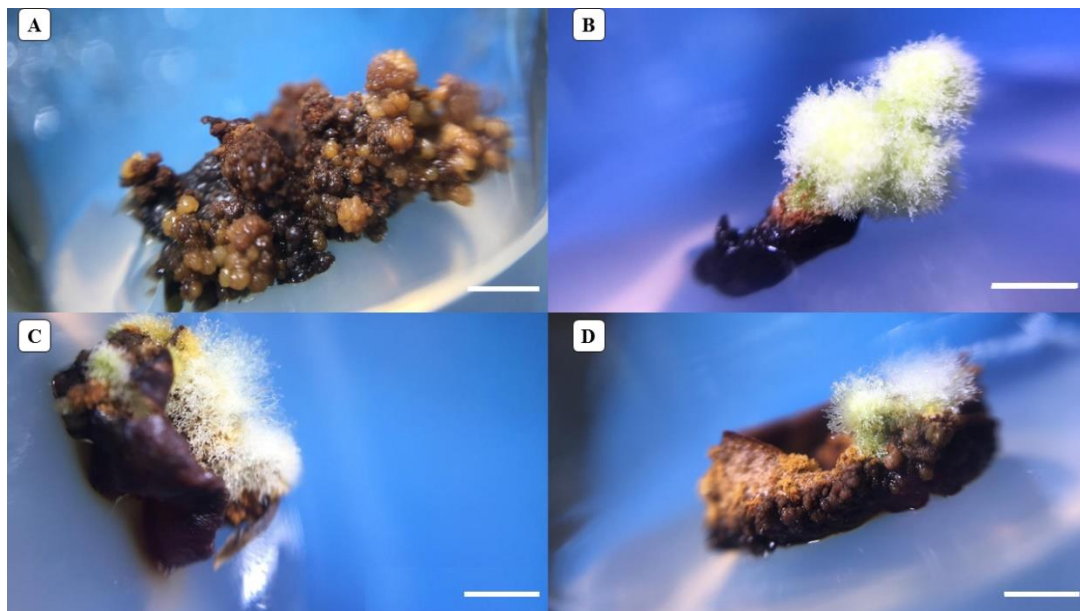


Figura 11. Textura dos calos formados em explantes de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). (A) Textura compacta em explante de segmento de caule; (B) Textura friável em explante de segmento de caule; (C) Textura semi-compacta em explante de folha; (D) Textura semi-friável em explante de folha. As barras horizontais representam 25 mm.

As cores brancas (Figuras 12 A, 13 A) e verde-claro (Figuras 12 B, 13 B) tiveram menor frequência nos calos, com aproximadamente 12% e 15% de presença, respectivamente, e em predominância nos segmentos de segmento de caule.

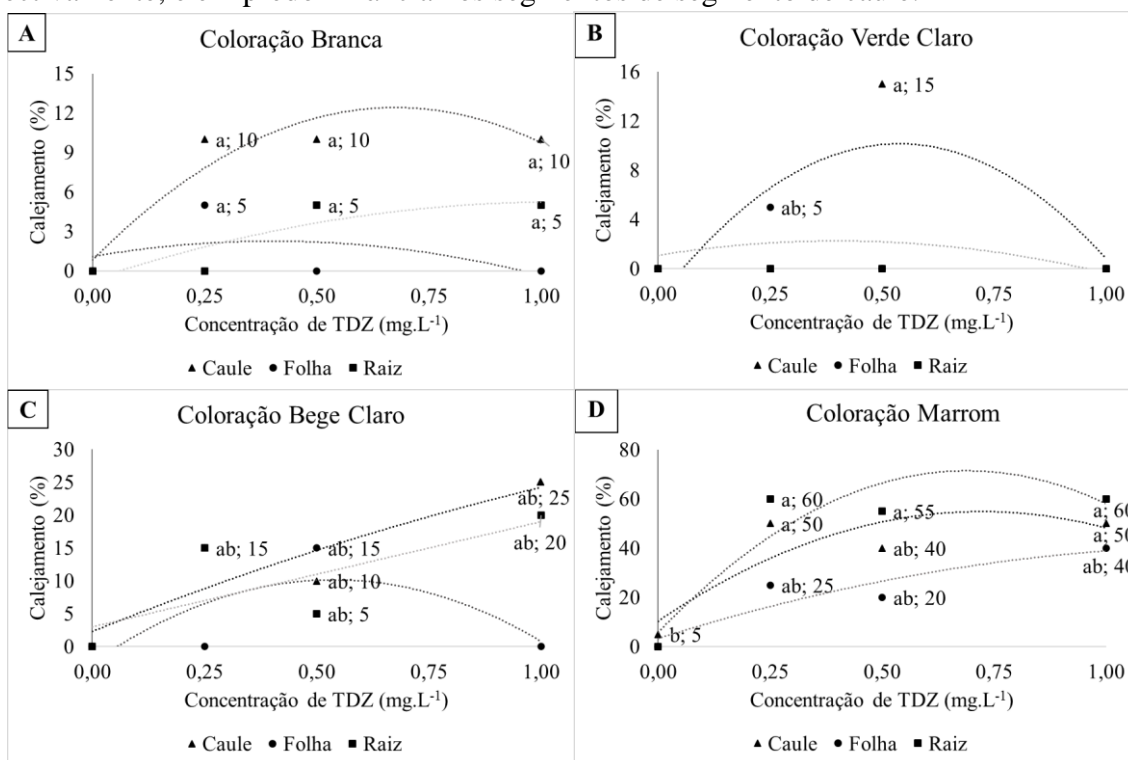


Figura 12. Coloração dos calos em explantes de *T. Ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). (A) Coloração branca; (B) Coloração verde claro; (C) Coloração bege claro; (D) Coloração marrom. Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si.

A coloração branca dos calos se mostrou mais presente conforme a concentração de TDZ aumentou, tendo o percentual máximo de caleijamento nessa cor na concentração calculada de 0,98 mg. L<sup>-1</sup> para explantes de raiz e 0,69 mg. L<sup>-1</sup> para segmentos de segmento de caule. Para coloração verde, cuja predominância esteve em explantes de segmento de caule e folha, sua concentração ótima calculada para tais explantes se deu em 0,51 mg. L<sup>-1</sup> e 0,47 mg. L<sup>-1</sup> respectivamente.

A cor bege (Figuras 12 C, 13 C) esteve presente em 25% dos calos formados, com tendência de aumento conforme o aumento da concentração de TDZ em explantes de segmento de caule e raiz. Por outro lado, para os explantes foliares, observou-se maior percentagem de calos nesta coloração na concentração máxima calculada de 0,51 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ.



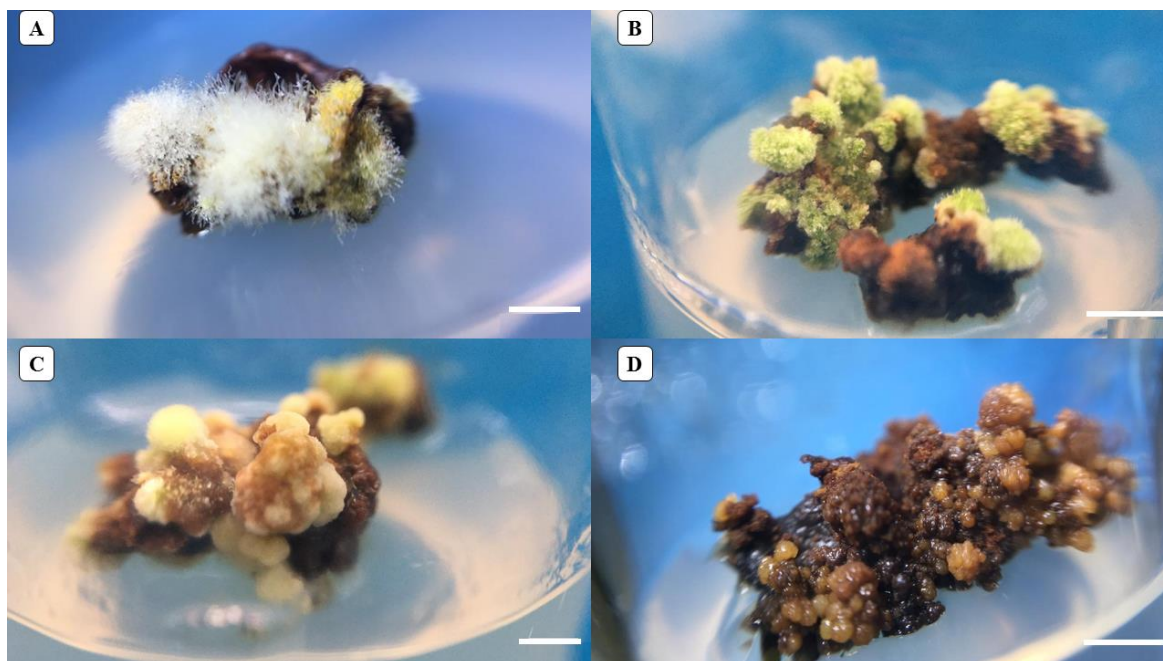


Figura 13. Coloração dos calos formados em explantes de *Toona ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ ( $\text{mg. L}^{-1}$ ). (A) Coloração branca em explante de folha; (B) Coloração verde claro em explante de segmento de caule; (C) Coloração bege claro em explante de raiz; (D) Coloração marrom em explante de segmento de caule. As barras horizontais representam 25 mm.

### 1.3.3. Organogênese

A organogênese precedida por calejamento em explantes de *T. Ciliata*, cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ e BAP mostrou nesse estudo respostas distintas de acordo com o explante e a concentração do biorregulador utilizada.

Houve organogênese precedida por calos somente em explantes de segmento de caule, com 43,8% de formação de brotos em explantes incubados na concentração de 0,25  $\text{mg. L}^{-1}$  de TDZ, seguido por 15,8% na concentração 0,5  $\text{mg. L}^{-1}$  e 10,5% na concentração 1,0  $\text{mg. L}^{-1}$  (Figura 14). Nos explantes de folha e de raiz não houve organogênese.



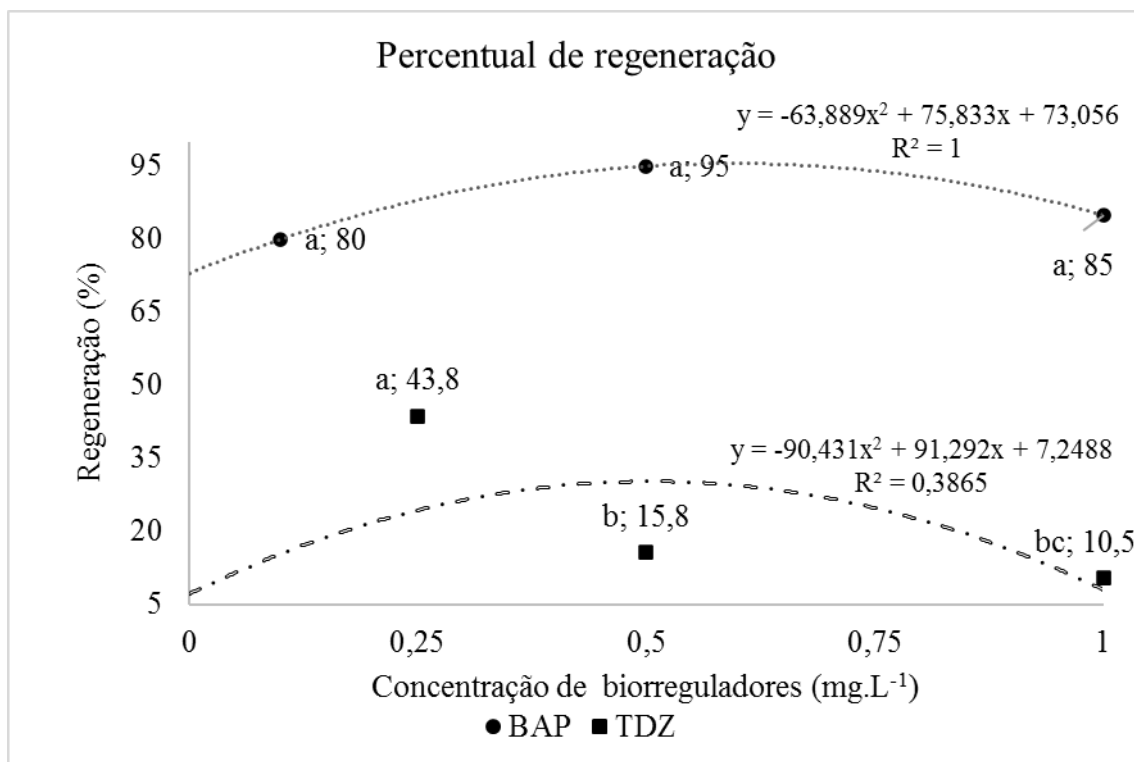


Figura 14. Percentual de regeneração de explantes juvenis de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05\%$ ). Valores seguidos por letras iguais não diferem significativamente.

O teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis apontou diferenças significativas entre as concentrações de TDZ na organogênese em explantes de segmento de caule, tendo a concentração de 0,25 mg. L<sup>-1</sup> demonstrado maior desempenho na regeneração de brotos.

Enquanto no experimento com BAP, houve organogênese direta em 86,6% de explantes de segmentos de caule. Dentre as brotações em segmentos de segmento de caule (Figura 14) o maior percentual de regeneração (95%) foi na concentração de 0,5 (mg. L<sup>-1</sup>) de BAP, seguido pelos percentuais de regeneração de 80% e 85% para as concentrações 0,1 e 1,0 (mg. L<sup>-1</sup>) respectivamente.

Quanto a formação de brotações nos explantes, houve diferenças entre os tratamentos de TDZ utilizados nos meios de cultivo onde a concentração de 0,25 mg. L<sup>-1</sup> proporcionou maior formação de folíolos por explante, com média de 1,56 folíolos por explante (Figura 15).

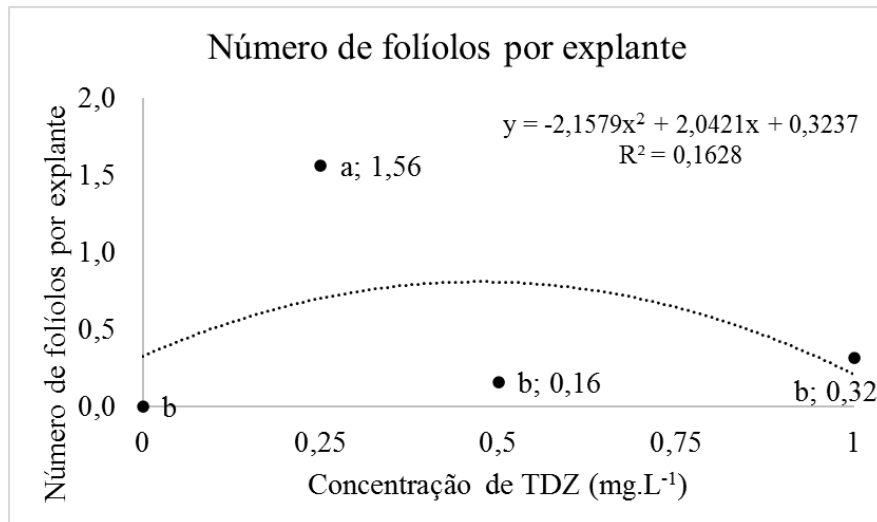


Figura 15. Número de folíolos formados em explantes juvenis de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). Teste de comparações múltiplas de Kruskal- Wallis. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente.

Sobre o experimento com BAP, houve aumento na quantidade de folíolos formados ao longo dos subcultivos realizados (Figura 16). Aos 30 dias a formação média de folíolos entre os tratamentos observado foi 2,9 e aos 60 dias 3,46. A maior formação de folíolos entre os períodos ocorreu na concentração 0,5 mg. L<sup>-1</sup> BAP com 3,75 folíolos aos 30 dias e 3,95 aos 60 dias, seguido pela concentração 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP com 2,7 e 3,43 folíolos.

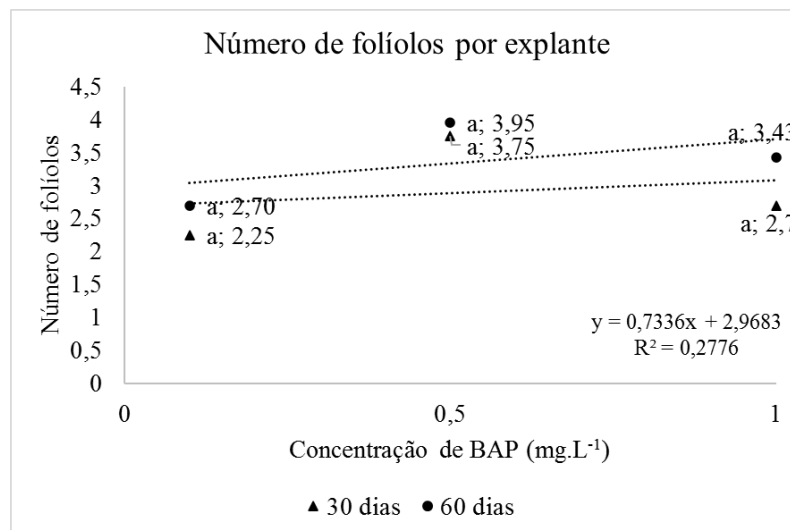


Figura 16. Número de folíolos regenerados em brotos de *T. ciliata* cultivados em meio com diferentes concentrações de BAP (mg. L<sup>-1</sup>). Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente.

Em relação as brotações aéreas formadas em explantes cultivados em meio com TDZ, observou-se inicialmente desenvolvimento anormal das plantas (Figura 17). Percebeu-se que os explantes desenvolveram hiperhidricidade, isto é, acúmulo de água anormal nas células (Figuras 17 A, B) e pouco cresceram (Figuras 17 C, D, E, F). A condição inicial das brotações pouco mudou mesmo após serem sub-cultivadas em meio MS+ 0,3 mg. L<sup>-1</sup> BAP+ 0,01 mg. L<sup>-1</sup> ANA, e acabaram senescendo, culminando na morte das mesmas.

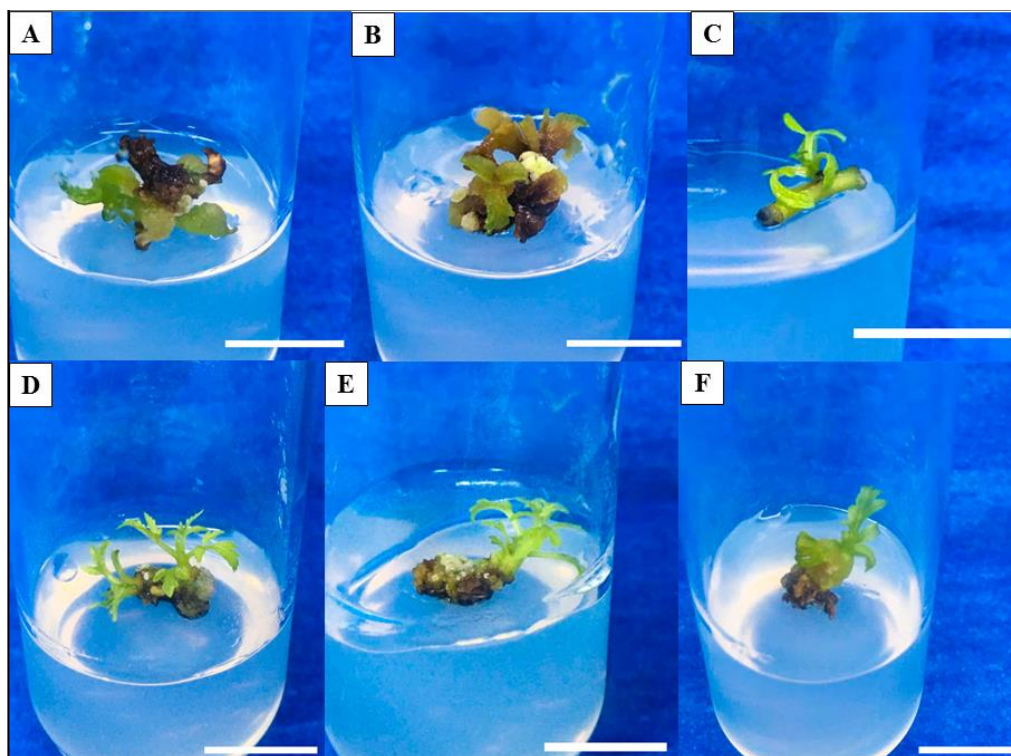


Figura 17. Regeneração em explantes juvenis de *T. ciliata*, cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ (mg. L<sup>-1</sup>). (A, B) Hiper-hidricidade em explantes; (C, D, E, F) Regeneração com crescimento anormal. Barras horizontais representam 10 mm.

Embora tenha sido observada a regeneração de brotações aéreas nos segmentos de segmento de caule a confirmação da origem das gemas, se axilares ou adventícias, depende da realização de análise histológica, etapa do estudo que ainda será desenvolvida.

#### 1.4. Discussões

Cada explante responde diferente quando em contato com os biorreguladores. A heterogeneidade de germinação bem como das respostas morfogênicas podem ser decorrentes da diversidade dentro de populações para essa espécie, dificultando o entendimento da organogênese de cada indivíduo, pois são variáveis geneticamente (Zhan et al., 2019).

No estudo conduzido por Frank et al. (2009), houve 31% de germinação *in vitro* de *T. ciliata*, taxa que foi considerada baixa, e apesar da observação da contaminação fúngica das sementes, a germinação limitada foi atribuída a inviabilidade de algumas sementes. Do mesmo modo, neste estudo as sementes de *T. ciliata* apresentaram perda de vigor ao longo do experimento, indicando que a propagação seminal pode ser limitada, enquanto o cultivo *in vitro* propicia a manutenção dos materiais selecionados por longo período, por meio de subcultivos sucessivos.

Percebeu-se nesse estudo menor oxidação em explantes cultivados em meio com BAP sendo 85% de segmentos de caule cultivados em concentração de 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP não apresentando estar oxidados na primeira avaliação. Ao contrário, somente 5% de explantes de caule e raiz cultivados em meio com 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ não apresentaram oxidação.

Estudos demonstram a possibilidade de relação entre o grau de oxidação e o tipo de explante. No presente estudo os segmentos de segmento de caule e raiz apresentaram menor oxidação tanto no cultivo com TDZ quanto em cultivo com BAP. Em cultivo de *Ipomoea turbinata* Lag. (Convolvulaceae), a utilização de TDZ proporcionou o aumento da biomassa do explante foliar e também demonstrou potencial de atividade antioxidante em 62,6% dos calos formados (Ahmad et al., 2019).

Sobre a utilização de citocininas nos meios de cultivo percebeu-se o potencial antioxidante de ambos biorreguladores empregados nesse estudo. Ao TDZ é relacionado o efeito de prevenção de amarelecimento das folhas e o aumento da atividade fotossintética estimulando a produção de clorofila (Nisler, 2018) e, ao BAP estão atribuídos efeitos de regulação da pigmentação fotossintética (Musieenko et al., 2014).

A região da regeneração também é uma avaliação importante pois indica a predisposição da regeneração ou calogênese do explante em resposta a influência do biorregulador e também ao estresse causado no momento de confecção do material estudado. No presente estudo, em explantes cultivados em meio tanto com TDZ quanto com BAP houve maior formação de calos e regeneração nas extremidades dos explantes. A regeneração nas extremidades dos explantes associada ao local de incisão pode estar relacionada a maior juvenildade do explante nessa região (Daquinta et al., 2003; Gharari e. al., 2019).

Diferentes genótipos podem exibir diferentes respostas na formação de calos em *T. ciliata* (Song et al., 2020). No estudo conduzido por Daquinta et al., (2003), os autores descrevem que a formação inicial dos calos se deu nas regiões da incisão, ou seja, nas

extremidades. Os autores argumentam que este resultado pode ser explicado pela juvenildade de células presentes na base da folha e ráquis ser maior do que em células do segmento distal.

Em *Scutellaria bornmuelleri* utilizando como explantes partes de folha, caule e pecíolo, houve maior formação de calos no local de excisão e explantes caulinares obtiveram predominância na formação de calos em todas as concentrações de TDZ utilizadas (Gharari et al., 2019).

Outro fator que pode influenciar a resposta é a concentração do biorregulador, em que diferentes partes de uma planta respondem a diferentes concentrações de um mesmo biorregulador (Fagan et al., 2015). Aragão et al. (2016) verificaram que segmentos cotiledonares de *Cedrela fissilis* Vell. com a presença de BAP no meio de cultura, mostraram resultados superiores aos segmentos do ápice, em nas mesmas condições experimentais.

Em relação a calogênese houve maior formação de calos no experimento com TDZ do que com o experimento com BAP. Houve 1,6% de calos em explantes de caule, sendo estes em baixa intensidade.

Apesar de ter baixa formação de calos no cultivo em meio com BAP (1,6%), a utilização de BAP pode induzir a formação de calos. Tal resposta é relatada por Feitosa et al. (2013) que observaram que a interação dos biorreguladores BAP e AIB induziu a formação de calos compactos em *Jatropha curcas* L., originando posteriormente a regeneração de brotações. Em *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) houve desenvolvimento de calos em 83-100% de explantes de hipocótilo e cotilédone em meio MS+ 3 mg. L<sup>-1</sup> BAP e 0,5 mg. L<sup>-1</sup> ANA (Klimek- Chodacka et al., 2020).

Dos calos formados em cultivo com TDZ houve percentual de 85% em segmentos de caule e raiz, na concentração 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ. Nessa concentração de TDZ (1,0 mg. L<sup>-1</sup>) também houve maior intensidade de calos, cobrindo todo explante, chegando a mudar o formato e não conseguindo distinguir entre os outros tipos de explante.

Concentrações médias de TDZ (entre 2,20 a 4,40 mg. L<sup>-1</sup>) podem resultar em organogênese e concentrações altas tendem a estimular a formação de calos.

A interação entre os explantes e a formação de calos pode estar relacionada com a concentração de hormônios endógenos nos explantes utilizados, visto que o TDZ pode regular os níveis de auxina, etileno, giberelina, ácido abscísico (Nisler, 2018). Em estudos similares a formação de calo em *T. ciliata*, em explantes de folhas jovens e ráquis das folhas obteve melhor resposta em concentrações 0,25 mg. L<sup>-1</sup> e 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ

(Daquinta et al., 2003, 2007). No cultivo de explantes caulinares de *Fagonia indica* Burm.f. (Zygophyllaceae) houve maior formação de calos em meio MS acrescido de 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ (Khan et al., 2016)

A coloração dos calos pode estar relacionada com a textura e indicativo da formação celular, podendo futuramente ser induzido a formar uma gema adventícia ou embrião somático. Cores mais escuras podem relacionar a oxidação do explante, indicando morte celular do mesmo. Neste estudo houve maior formação de calos de coloração marrom (60%) em explantes de caule e raiz e baixa formação de calos de cores branca, verde-claro e bege.

Em segmentos de epicótilo de *Dipterix odorata* (Aubl.) Willd. houve maior média de formação de calos em meio MS+ 8,0 mg. L<sup>-1</sup> TDZ e 1,5 mg. L<sup>-1</sup> ANA, sendo a maioria dos calos friáveis e translúcidos, com coloração variando de bege a marrom claro (Sampaio et al., 2018). Em *Azidirachta indica* A. Juss. o cultivo de explantes de folha e pecíolo em meio MS+ 0,6 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ proporcionou maior peso fresco de calos, formando calos com cor verde, marrom e creme (Ashokhan et al., 2020).

Apesar de ter baixa formação de calos nesse estudo (1,6%), a utilização de BAP pode induzir a formação de calos, como relatado por Feitosa et al. (2013) que observaram que a interação dos biorreguladores BAP e AIB induziu a formação de calos compactos em *Jatropha curcas* L., originando posteriormente a regeneração de brotações. Em *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) houve desenvolvimento de calos em 83-100% de explantes de segmento de caule e cotilédone em meio MS+ 3 mg. L<sup>-1</sup> BAP e 0,5 mg. L<sup>-1</sup> ANA (Klimek- Chodacka et al., 2020).

A formação de órgãos em explantes vegetais é uma resposta desejada quando testados em cultivo com biorreguladores. Nesse estudo de todos os explantes de segmentos de caule testados em cultivo com diferentes concentrações de BAP 86,6% formaram gemas adventícias e, no cultivo com TDZ de todos os explantes de segmento de caule 23,4% formaram gemas.

No presente estudo a utilização de 0,25 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ proporcionou uma resposta de formação órgãos aéreos em 43,8% em explantes de segmentos de caule. Em *Pterocarpus marsupium* Roxb. (Fabaceae), o maior número de brotações por explante foi obtida em meio MS acrescido de 0,173 mg. L<sup>-1</sup> de GA e 0,11 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ, em 85% das culturas após 8 semanas de cultivo e concentrações acima de 0,22 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ induziam a menores respostas (30%) (Ahmad et al., 2020).

No presente estudo, a utilização de TDZ induziu a formação de plantas anormais e deficientes. O uso contínuo de TZD em cultura de tecidos, pode resultar em anormalidades como hiper-hidricidade, necrose no meristema apical, nos brotos e tecido de formação de calo e variação citogenética (Dewir et al., 2018). Outro efeito do TDZ em cultivo *in vitro*, também observado no presente estudo, é a inibição de alongação de brotos (Dinani et al., 2018).

Em relação a formação de gemas induzidas pelo BAP, nesse estudo verificou-se que 95% dos segmentos de caule cultivados em 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP formaram gemas adventícias. Song et al., (2020) utilizaram explantes de cotilédones e nós cotiledonares de *T. ciliata* cultivados em meio MS acrescido de 0,5 mg. L<sup>-1</sup> BAP, 0,5 mg. L<sup>-1</sup> Cinetina e 0,05 mg. L<sup>-1</sup> ANA e obtiveram formação de 7,33 e 6,67 brotos por explantes, respectivamente. Li et al., (2018) utilizaram explantes de segmento de caule de *T. ciliata* em meio MS + 0,5 mg. L<sup>-1</sup> BAP+ 1 mg. L<sup>-1</sup> de cinetina +0,1 mg. L<sup>-1</sup> AIB e obtiveram taxa de regeneração de 59,67% com formação média de 4 brotos por explante.

Em outras espécies vegetais pode se observar que o BAP pode proporcionar bons resultados como na regeneração em *Ixora chinensis* Lam. a partir de explantes foliares, cujo resultado ótimo ocorreu em meio MS acrescido com 4,0 mg. L<sup>-1</sup> BAP, 1,0 mg. L<sup>-1</sup> TDZ e 1,0 mg. L<sup>-1</sup> ANA, obtendo 23,7% de regeneração (Li et al., 2019).

Em *Melia azedarach* L. houve uma média de 6,5 brotos regenerados em meio MS+ 0,1 mg. L<sup>-1</sup> TDZ+ 2,0 mg. L<sup>-1</sup> BAP, a partir de explantes de segmentos nodais (Amiri et al., 2020). Explantes de epicótilo de *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. obtiveram 92% de regeneração em meio MS acrescido de 3,0 mg. L<sup>-1</sup> BA, 1,0 mg. L<sup>-1</sup> AIA e 100 mg. L<sup>-1</sup> PVP (Thirumurugan et al., 2020).

## 1.5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos nestas condições experimentais, pode-se concluir:

- Houve formação de gemas adventícias em explantes de segmento de caule de plantas juvenis de *Toona ciliata* cultivados em meio com concentrações 0,25, 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ, apresentando taxa de regeneração de 43,8%, 15,8% e 10,5% respectivamente;
- Em gemas formadas nos segmentos de caule em cultivo com concentração de 0,25 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ houve formação média de 1,56 folíolos.
- Houve calogênese em 85,5% dos explantes de segmento de caule e raiz, cultivados em meio com concentração de 1,0 mg. L<sup>-1</sup> TDZ.
- O TDZ é um biorregulador que proporciona resposta morfogênica para a espécie.
- Houve formação de calos em 1,6% dos explantes de segmento de caule nas concentrações 0,5 e 1,0 (mg. L<sup>-1</sup>) de BAP.
- Explantes de segmentos de segmento de caule de *T. ciliata* demonstraram melhor potencial morfogênico, com 95%, 85% e 80% de regeneração de brotos aéreos, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 0,1 mg. L<sup>-1</sup> BAP;
- A média de folíolos em brotos regenerados via organogênese em cultivo com 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP foi de 3,75 aos 30 dias e 3,95 aos 60 dias.
- BAP é um promissor biorregulador a ser utilizado para organogênese da espécie.
- Segmento de caule é o explante mais promissor para organogênese.



## Capítulo II. Multiplicação de brotos aéreos de *Toona ciliata* var. *australis* regenerados via organogênese *in vitro*

### Resumo

O cedro australiano é uma espécie lenhosa com relevante interesse comercial para produção de móveis, perfumaria e medicamentos, além de demonstrar crescimento favorável em reflorestamento e plantio consorciado. No entanto, existem dificuldades na sua propagação seminal, pela altura da copa das árvores que dificulta a coleta de sementes e baixa viabilidade das mesmas, tornando técnicas de clonagem, como a micropropagação, alternativas para sua multiplicação. Nesse aspecto, esse estudo teve por objetivos multiplicar brotações adventícias de cedro australiano regeneradas via organogênese *in vitro*. As gemas provindas da organogênese *in vitro* de concentrações de BAP (0,1; 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>) foram multiplicadas em meio MS acrescido de 0,3 mg. L<sup>-1</sup> BAP e 0,01 mg. L<sup>-1</sup> de ANA e posteriormente foram pré-aclimatadas em vidros e tubetes plásticos contendo substrato autoclavado para formação de raízes adventícias. A taxa de multiplicação dos brotos aéreos obtida aos 90 dias foi de 1,66 em explantes regenerados em meio com 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP. Aos 180 dias, houve 34,14% de enraizamento *in vitro* de brotações provindas da concentração de 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP. Aos 240 dias houve maior desenvolvimento de brotações regeneradas na concentração 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, com 142,0 mm em altura total, 92,0 mm em parte aérea e 50 mm em raiz e observou-se maior formação de raízes adventícias *ex vitro* (63,15%) em brotações regeneradas com 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP.

### 2.1. Introdução

O Cedro-australiano (*Toona ciliata* M. Roem.), é uma espécie endêmica da Ásia, no entanto foi introduzida no Brasil em 1973 pela empresa Aracruz Florestal: Aracruz Celulose (Kalil Filho e Wendling, 2012). É uma espécie com elevado valor comercial, por ter crescimento rápido e madeira com ótima qualidade para produção de móveis, naval e perfumaria (Zhan et al., 2019). Além de possuir resistência a *Hypsipyla grandella* Zeller tornando o cultivo consorciado com outras espécies mais apreciado (Hilje, 2020). Outra qualidade é ter fitoconstituintes utilizados amplamente como princípio ativo para tratamentos de doenças como câncer, diabetes, uso como anti-inflamatório, dentre outros (Zhang et al., 2012; Rana et al., 2016; Leo et al., 2018; Beseni et al., 2019).

No entanto sua propagação por meio seminal é dificultada devido a coleta de sementes, visto que as árvores podem chegar a 30 metros de altura, além da curta

viabilidade das sementes (Kalil Filho e Wendling, 2012). Alternativas como a cultura de tecidos ou micropropagação tem-se mostrado interessantes para essa espécie, dada a uniformidade e a possibilidade de multiplicação das plantas *in vitro*.

A micropropagação compõe-se de técnicas de propagação vegetativa onde podem ser utilizados segmentos de qualquer órgão, explante, os quais se submetidos ao tratamento e condições adequadas, podem regenerar com sucesso uma planta completa (Hartmann et al., 2014). A técnica possui três sistemas para induzir a regeneração, a proliferação de gemas axilares, a organogênese e a embriogênese somática (Torres et al, 1998).

Uma vez obtida a regeneração via organogênese ou proliferação por gemas axilares da espécie em questão, prossegue-se com a multiplicação e a indução de formação radicular das mesmas, por meio de subcultivos em meio de cultivo novo e fresco e posterior transplântio das plantas para substrato adequado visando a aclimatização (Torres et al, 1998). O subcultivo consiste em dividir em segmentos menores as plantas formadas no cultivo *in vitro* e transferi-los para meio fresco, enquanto o transplântio por sua vez, é a transferência da planta formada, da forma como está, sem dividir ou cortar parte da raiz para o substrato (Hartmann et al., 2014).

Os estudos de micropropagação em *T. ciliata* ainda são incipientes, citando como exemplo experimentos nessa linha, Liao et al. (2017) onde descrevem o efeito dos meios de cultivo para essa espécie, Daquinta et al. (2003, 2005, 2007) em que verificaram a calogênese de explantes de plantas de 2 anos de idade e de plantas adultas cultivados em meio com diferentes concentrações de TDZ. Mroginski et al. (2003) avaliaram a regeneração de explantes cultivados em meio com BAP e AIB, no entanto, mais especificações sobre a multiplicação das brotações aéreas e sua aclimatização não foram discutidas.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito residual do biorregulador BAP na multiplicação *in vitro* de brotações aéreas de *T. ciliata*, obtidas via organogênese e seu efeito na biometria e enraizamento das plantas.

## 2.2. Material e Métodos

### 2.2.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido nas dependências dos Laboratórios de Silvicultura, situado no Departamento de Engenharia Florestal e no Laboratório de Biotecnologia,

lotado no Centro Integrado de Pesquisas de Biomassa, Biotecnologia e Bioenergia da Universidade Estadual do Centro-Oeste, em Irati, Paraná.

### 2.2.2. Material vegetal

Foram utilizados como explantes, brotações aéreas da espécie *Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* regeneradas via organogênese direta, a partir de segmentos de caule. As brotações foram obtidas a partir do cultivo em meio basal MS (Murashige e Skoog, 1962) com diferentes concentrações de BAP (0,1; 0,5 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>) e apresentavam aproximadamente 1,5 cm de comprimento, e possuíam entre três e quatro folíolos (Figura 1).



Figura 1. Brotos aéreos de *T. ciliata* regenerados via organogênese direta, cultivados em meio com diferentes concentrações de BAP (mg. L<sup>-1</sup>). Barras horizontais representam 10 mm.

### 2.2.3. Meio de cultivo para multiplicação de brotos

O meio de cultivo utilizado para a multiplicação dos brotos aéreos nos diferentes subcultivos, constituiu-se pelos sais de MS, acrescido de sacarose (30,0 g. L<sup>-1</sup>); mio Inositol (100 mg. L<sup>-1</sup>), 0,3 mg. L<sup>-1</sup> BAP e 0,01 mg. L<sup>-1</sup> ANA e ágar Vetec<sup>®</sup> (6 g. L<sup>-1</sup>). Após o preparo, o pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , utilizando-se soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol. L<sup>-1</sup> e de ácido clorídrico (HCl) 1 mol. L<sup>-1</sup>.

O ágar foi fundido em forno de micro-ondas e adicionado ao meio após o ajuste do pH, prosseguindo para a distribuição do meio em tubos de ensaio (150 x 25 mm), sendo vertidos 10 mL de meio de cultivo em cada tubo de ensaio, os quais foram vedados com tampa de polipropileno. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C e 1,5 atm. de pressão, por 20 minutos.

Após à inoculação dos explantes nos meios de cultivo, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento a  $25 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz e oito

horas de escuro, e intensidade luminosa de  $27 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ , obtida por lâmpadas brancas de *led*, tipo luz do dia.

Os subcultivos dos explantes no meio de cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar, em que os brotos aéreos foram subdivididos e individualizados, constituindo os brotos repicados para novos tubos de ensaio contendo meio de cultura fresco (Figura 2 A). Tomou-se o cuidado de utilizar brotos com aproximadamente três cm de comprimento e entre três a quatro folíolos por broto, os quais foram inoculados em novo meio de cultivo.

Os subcultivos em meio fresco foram realizados aos 60 e 90 dias (Figura 3) após ter ocorrido a regeneração, constituindo-se da retirada das brotações do tubo de ensaio e excisão das raízes adventícias formadas em meio de cultivo de multiplicação (Figura 2 B), e posterior inoculação de brotações em novo meio de cultivo, com mesma concentração, fresco.

#### 2.2.4. Aclimação

A transferência das plantas cultivadas em meio de cultivo *in vitro* para frascos contendo substrato ocorreu aos 180 dias após a primeira inoculação *in vitro*, quando os brotos tinham aproximadamente cinco centímetros de comprimento. As brotações foram retiradas dos tubos de ensaio, lavadas em água corrente para remoção de meio de cultivo, e em seguida transplantadas para frascos de vidro (13,5 cm de altura e 10,0 cm de largura), contendo cerca de 250 g de substrato Agrinobre<sup>®</sup> esterilizado em autoclave, vedados com filme plástico (Figura 2 C) e mantidos em sala de crescimento.

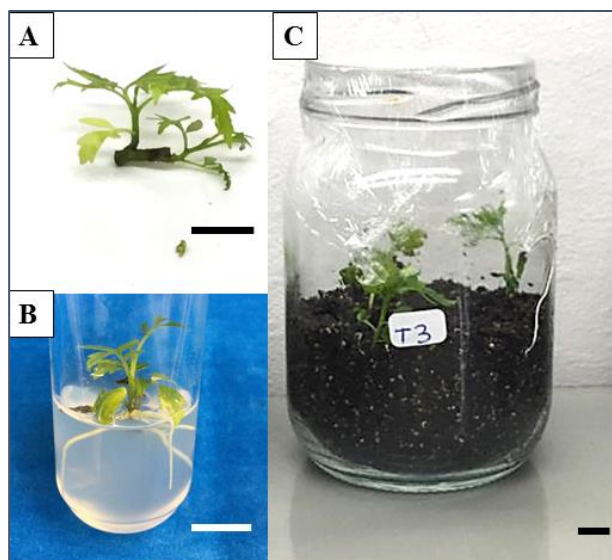


Figura 2. Multiplicação e enraizamento de brotos aéreos de *T. ciliata*. (A) Explante inicial; (B) Brotos durante o subcultivo; (C) Brotos transplantados para substrato.

As plantas permaneceram nos frascos de vidro por 60 dias, sendo irrigadas a cada três dias com água deionizada autoclavada, não sendo realizado o acréscimo de nutrientes. Após esse período, quando as plantas completaram 240 dias, tendo brotações com aproximadamente 10 cm de comprimento, foram transferidas para tubetes de polipropileno com 115 cm<sup>3</sup>, contendo substrato Agrinobre® esterilizado em autoclave e posteriormente foram mantidas em casa de vegetação (Figura 3).

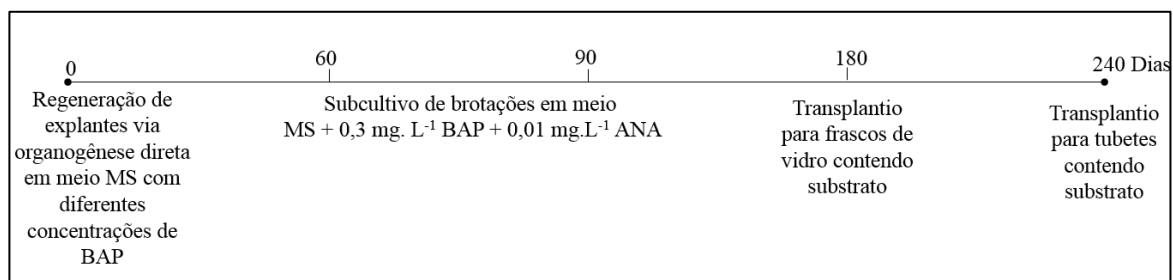


Figura 3. Cronologia experimental.

### 2.2.5. Delineamento experimental e análise de dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo avaliado o efeito residual do BAP na multiplicação de brotações aéreas regeneradas via organogênese direta em meio de cultivo com diferentes concentrações de BAP, em mg. L<sup>-1</sup>: 0,1; 0,5; 1,0. Foram utilizadas quatro repetições constituídas por quatro brotações em cada tratamento com BAP, sendo inoculado um broto por tubo de ensaio.

Quanto a taxa de multiplicação, aos 60 e 90 dias após a regeneração de brotações nos explantes, avaliou-se a quantidade de brotações formadas a partir de um único

propágulo ou broto aéreo, e nestes verificou-se também a quantidade de folíolos formados.

Aos 180 e aos 240 dias de cultivo avaliou-se a biometria das plantas, mensurando-se o comprimento total da parte aérea e das raízes com o auxílio de um paquímetro digital, e o percentual de enraizamento *in vitro* e no substrato.

Os dados não atenderam aos pressupostos da ANOVA, sendo utilizado nesse estudo o teste não paramétrico de Kruskal- Wallis para comparação de médias a 5% de probabilidade de erro. Realizou-se a análise de regressão e ajuste dos parâmetros para os dados. As análises estatísticas foram realizadas no *software* Action (Equipe Estatcamp, 2014).

### 2.3. Resultados

A quantidade de brotações formadas em explantes regenerados via organogênese em meio MS contendo 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP aos 60 dias fez taxa de multiplicação de 1,63, sendo posteriormente, aos 90 dias observado maior taxa de multiplicação (1,66) em explantes que foram obtidos a partir da organogênese induzida por meio de cultivo contendo 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP.

Observou-se também menores taxas de multiplicação (1,24) em explantes regenerados em meio com concentração 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, nos subcultivos avaliados aos 60 e 90 dias (Figura 4).

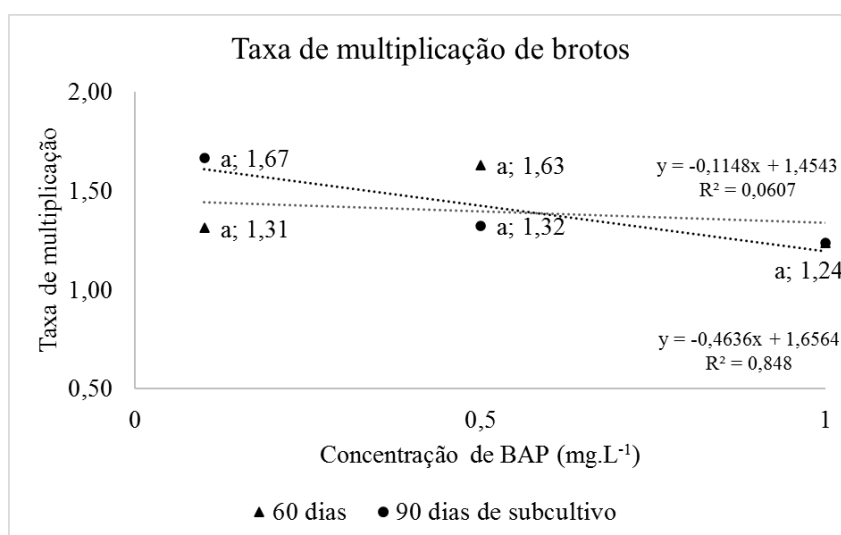


Figura 4. Taxa de multiplicação de brotações aéreas de *T. ciliata* providas da organogênese induzida com diferentes concentrações de BAP (mg. L<sup>-1</sup>). Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente.

Quanto a formação de folíolos em explantes regenerados via organogênese, observou-se que o efeito residual do meio de cultivo contendo BAP aos 90 dias, não teve diferença significativa entre as diferentes concentrações empregadas, no entanto aos 180 dias de cultivo as concentrações de 0,1 e 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, obtiveram maior destaque na indução na formação de folíolos com 10,1 e 9,4 folíolos formados, conseqüentemente (Figura 5).

O incremento médio na formação de folíolos foi de 62,6%, entre as avaliações realizadas aos 90 e 180 dias.

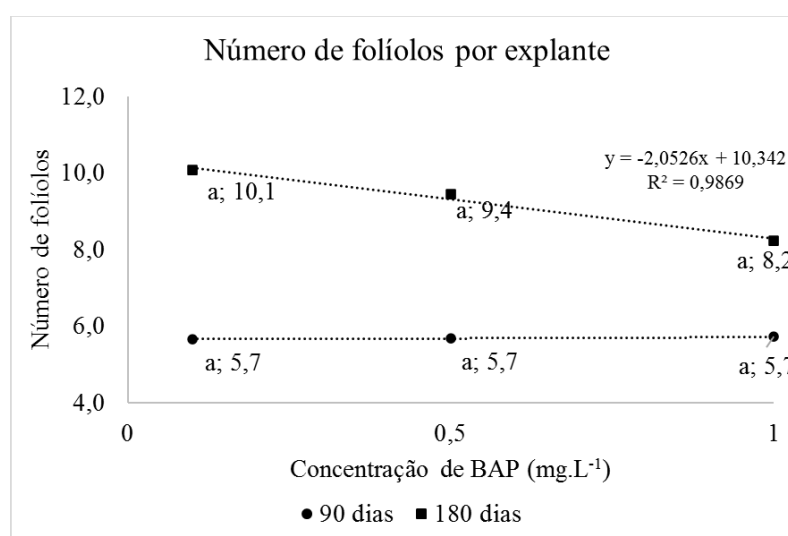


Figura 5. Número de folíolos formados por broto aéreo de *T. ciliata*, provindas da organogênese induzida com diferentes concentrações de BAP (mg. L<sup>-1</sup>). Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente.

A avaliação biométrica das plantas demonstra a evolução do crescimento delas em um dado período. Nesse estudo, as brotações aéreas obtidas nos meios com diferentes concentrações de BAP (Figura 6), mostrou que aos 180 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos, tendo os valores médios de comprimento total 55,3 mm, da parte aérea 44,2 mm e de raiz 9,23 mm.

Em relação ao percentual de enraizamento das plantas *in vitro* (Figura 7), aos 180 dias, o efeito residual da concentração de 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP durante a organogênese, mostrou maior influência na formação radicular em 34,14% das brotações.

No entanto, aos 240 dias houve diferença significativa entre o efeito residual de concentrações e o tratamento com 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP apresentou maiores valores para as três variáveis mensuradas, sendo de 142,0 mm para o crescimento em altura total (Figura

6 A), 92,0 mm em parte aérea (Figura 6 B) e 50 mm em raiz (Figura 6 C) e, nessa avaliação observou-se maior formação de raízes adventícias (63,15%) em brotações advindas da regeneração via organogênese em meio com concentração 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP.

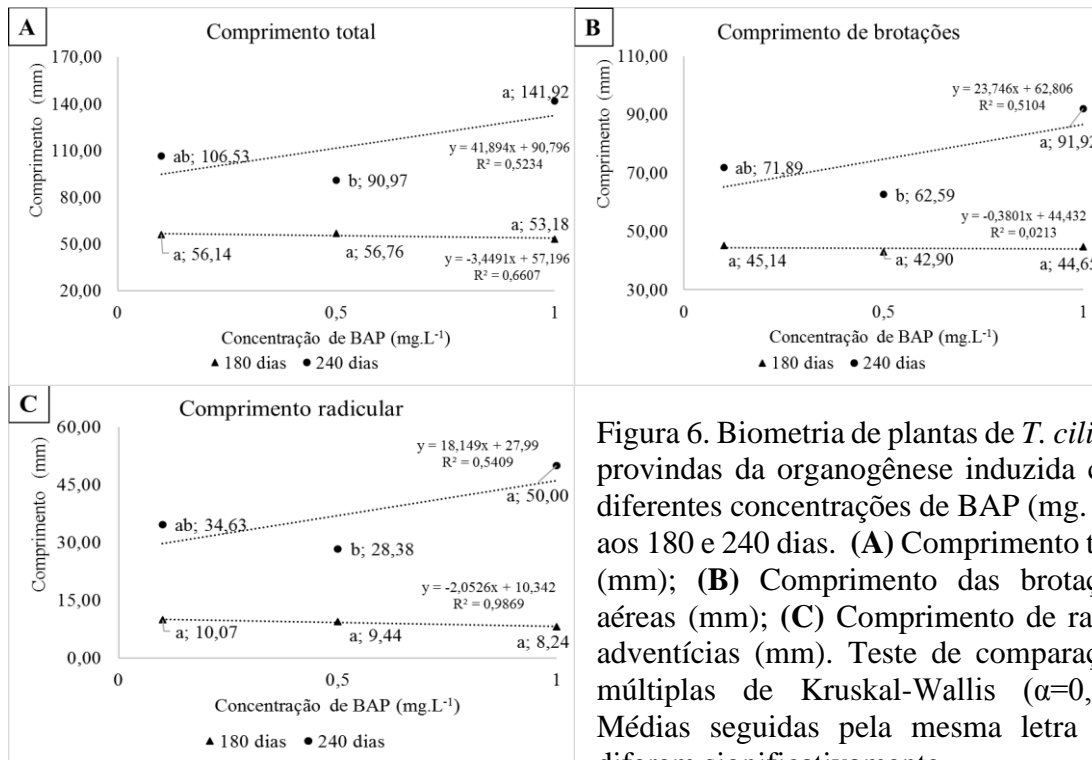


Figura 6. Biometria de plantas de *T. ciliata*, providas da organogênese induzida com diferentes concentrações de BAP (mg. L<sup>-1</sup>) aos 180 e 240 dias. (A) Comprimento total (mm); (B) Comprimento das brotações aéreas (mm); (C) Comprimento de raízes adventícias (mm). Teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente.

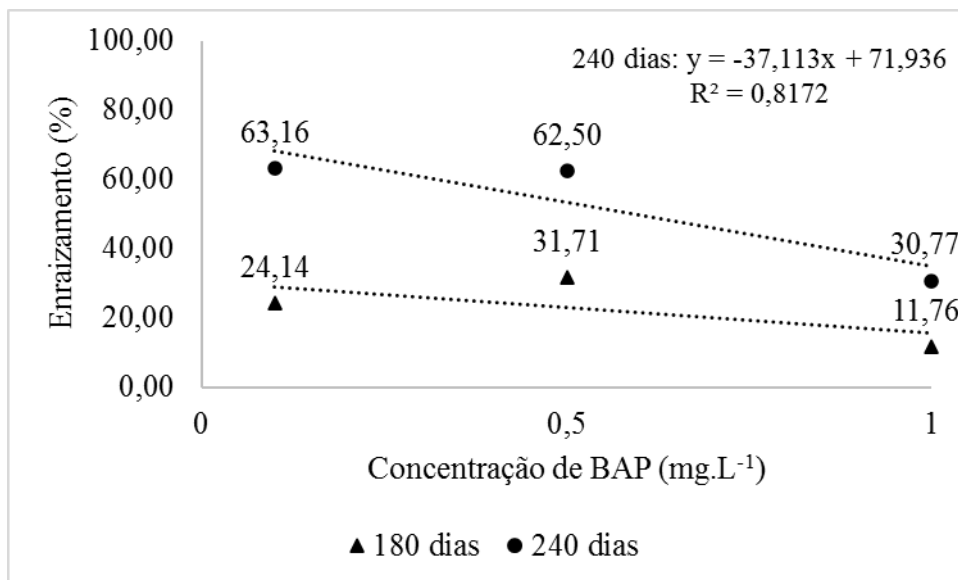


Figura 7. Percentual de enraizamento das plantas de *T. ciliata* providas da organogênese induzida com diferentes concentrações de BAP (mg. L<sup>-1</sup>) avaliadas aos 180, em condições *in vitro* e 240 dias, após a transferência das plantas para substrato, em condições *ex vitro*.



O efeito do enraizamento no substrato pode ser observado na figura 8, nota-se menor formação de raízes secundárias nas plantas em condição *in vitro* aos 180 dias (Figura 8 A, B, C) e maior desenvolvimento radicular em condições *ex vitro* (Figura 8 D, E, F).

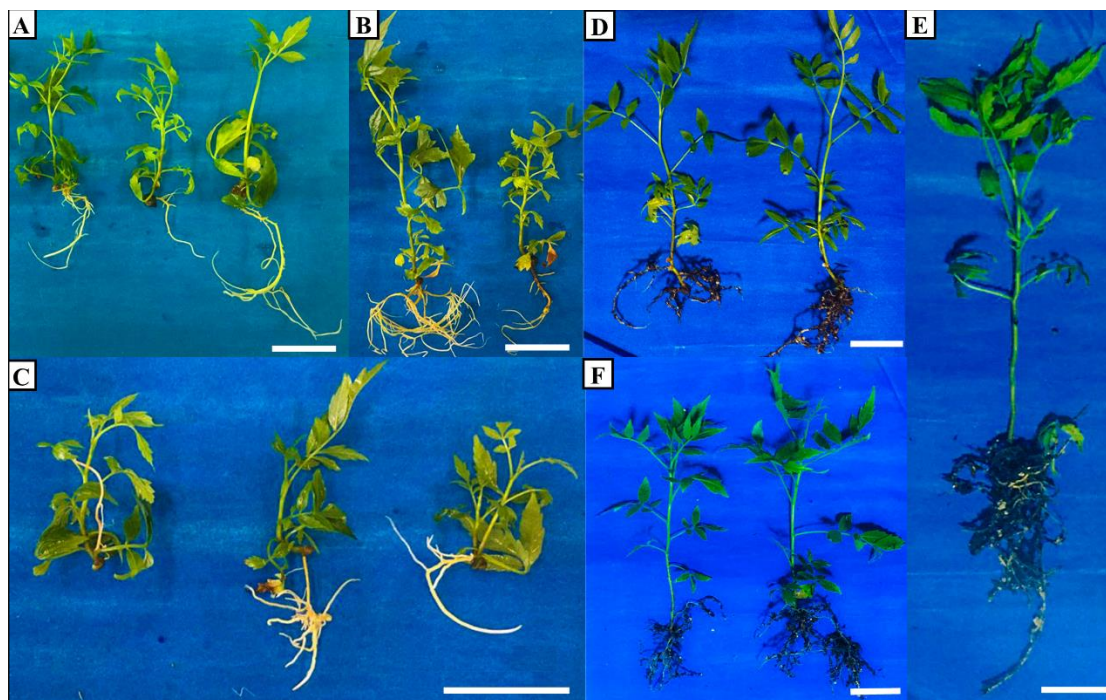


Figura 8. Plantas de *T. ciliata* provindas da organogênese induzida com diferentes concentrações de BAP ( $\text{mg. L}^{-1}$ ). (A) Plantas com 180 dias regeneradas em meio com  $0,1 \text{ mg. L}^{-1}$  de BAP; (B) Plantas com 180 dias regeneradas em meio com  $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$  de BAP; (C) Plantas com 180 dias regeneradas em meio com  $1,0 \text{ mg. L}^{-1}$  de BAP; (D) Plantas com 240 dias regeneradas em meio com  $0,1 \text{ mg. L}^{-1}$  de BAP; (E) Planta com 240 dias regeneradas em meio com  $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$  de BAP; (F) Plantas com 240 dias regeneradas em meio com  $1,0 \text{ mg. L}^{-1}$  de BAP. As barras horizontais representam 25 mm.

#### 2.4. Discussões

A multiplicação de brotações estabelecidas via organogênese *in vitro* é um procedimento necessário para a produção do maior número de plantas possíveis além de ser uma etapa importante para o estabelecimento e desenvolvimento saudável da planta (George et al., 2008).

No presente estudo observou-se o efeito residual do BAP em brotações obtidas a partir da organogênese *in vitro* durante a fase de multiplicação e aclimação, no qual após 60 dias da regeneração, a maior taxa de multiplicação (1,63) se deu em brotações oriundas da regeneração induzida por  $0,5 \text{ mg. L}^{-1}$  de BAP e aos 90 dias a maior taxa de

multiplicação (1,66) ocorreu em brotos formados a partir do cultivo em meio com 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP.

Em comparação com a literatura sobre estudos semelhantes com a mesma espécie, os valores de taxa de multiplicação do presente estudo foram inferiores. Liao et al. (2017) obtiveram taxa de multiplicação de *T. ciliata* de 2,18 em meio MS + 6-BA 0,5 mg. L<sup>-1</sup>+ IBA 0,05 mg. L<sup>-1</sup>, no entanto os autores concluíram que o melhor meio básico para multiplicação da espécie é o WPM, cujo meio apresentou taxa de multiplicação de 4,29.

Em outras espécies lenhosas, a aplicação de BAP ao meio de cultivo mostra-se eficiente na fase de multiplicação como em Jequitibá-branco (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze) em que a concentração de 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP em meio MS mostrou-se eficiente na multiplicação dos explantes, formando em média 3,5 brotos por explante e a adição de 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de AIB em meio MS de cultivo, proporcionou formação de 55% de raízes (Albino et al., 2019).

Em *Swietenia macrophylla* King. obteve-se maior taxa de multiplicação em meio MS com 5,31 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, enquanto as concentrações acima de 11,2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP inibiram a formação de brotações (Schottz et al., 2007).

Maior número de brotações de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. foi obtido em meio de cultivo acrescido com BAP, no entanto o aumento da concentração deste biorregulador proporcionou menores comprimentos de brotações durante a fase de multiplicação (Goelzer et al., 2019). Em *Hancornia speciosa* Gomes., os explantes apresentaram-se mais responsivos em relação a taxa de multiplicação *in vitro* e indução de brotações em meio com ausência de BAP (Oliveira et al., 2019).

Nesse estudo verificou-se menor taxa de multiplicação em relação ao aumento da concentração de BAP (Figura 3) efeito que pode ser explicado pela toxidez do biorregulador, corroborando com o estudo conduzido por Vasconcelos et al., (2019), no qual percentual de resposta de explantes de *Amburana cearensis* A.C. Smith (sin. *Torresea cearensis* Fr. All) mostrou relação linear negativa com as concentrações de BAP utilizadas no meio de cultivo, indicando efeito fitotóxico do biorregulador quando aplicado em maiores concentrações.

De mesma forma a utilização de BAP no cultivo *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Sm. induziu deficiências a longo prazo no fotossistema II das plantas tratadas com 3,4 e 4,5 mg. L<sup>-1</sup> BAP, resultando em menor densidade de estômatos e menor concentração de pigmentos fotossintéticos (Martins et al., 2018).

A adição de 0,56 mg. L<sup>-1</sup> BA no cultivo *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell. proporcionou o incremento e o crescimento de brotações em segmentos nodais, com média de 2 brotos por explante e com tamanho médio de 1,2 cm da parte aérea (Aragão et al., 2016). Em *Khaya ivorensis* A. Chev. houve melhor desenvolvimento na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais em meio MS acrescido de 2,25 mg. L<sup>-1</sup> BAP, com formação média de 3 brotos por explante (Haliza et al., 2014).

O efeito residual de biorreguladores pode influenciar positivamente no crescimento de brotações, corroborando os resultados obtidos no presente estudo, Song, Mao e Shang (2020) observaram que plantas de *T. ciliata* cultivadas em 0,5 mg. L<sup>-1</sup> BAP, 0,5 mg. L<sup>-1</sup> cinetina e 0,05 mg. L<sup>-1</sup> ANA e obtiveram maior incremento em altura com média de 3,4 cm por broto.

Em relação ao enraizamento, observou-se elevado incremento de formação das raízes adventícias após o transplante das plantas para substrato. Houve 71,3 % de incremento em plantas cultivadas com 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, 53,8 % em 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP e 100% em 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP. Tal incremento é relativo às brotações que não tinham raízes visíveis formadas e que se desenvolveram em substrato.

Nesse sentido o enraizamento *ex vitro* apresenta vantagens ao induzir a formação de raízes funcionais, com maior qualidade e maior quantidade de raízes secundárias, além de eliminar a fase operacional de enraizamento *in vitro* diminuindo custos (Torres et al., 1998). Isso pode explicar a diferença entre o percentual de enraizamento *in vitro* obtido nesse estudo (34,14%) aos 180 dias, para as plantas que haviam sido cultivadas em 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP enquanto aos 240 dias obteve-se 63,15% de enraizamento das plantas cultivadas em 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP após a transferência das mesmas para substrato.

Em *Passiflora foetida* L., brotações tratadas com 300 mg. L<sup>-1</sup> de AIB por cinco minutos tiveram melhor enraizamento *ex vitro* em comparação com *in vitro* (Shekhawat et al., 2015).

O percentual de enraizamento em substrato obtido no presente estudo (63,15%) é semelhante aos percentuais de enraizamento *in vitro* descritos na literatura para essa mesma espécie como no estudo conduzido por Mroginski et al. (2003) tendo 62,5% de enraizamento em meio de cultivo ¼ MS + 0,1 mg. L<sup>-1</sup> AIB; Liao et al. (2017) obtiveram 100% de enraizamento em meio de cultivo ½ MS+ IBA 0,05 mg. L<sup>-1</sup> + NAA 0,5 mg. L<sup>-1</sup>; e, Li et al. (2018) obtiveram melhor enraizamento (93,33%) em meio ½ MS+ 0,1 mg. L<sup>-1</sup> ANA, indicando que há potencial de proceder este estágio de micropropagação, para *T. ciliata ex vitro*.

## 2.5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos nestas condições experimentais, conclui-se que:

- A maior taxa de multiplicação dos brotos aéreos foi obtida aos 60 dias (1,63) em explantes cultivados em meio com 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP. Aos 90 dias de subcultivo, a maior taxa de multiplicação (1,66) foi obtida na concentração 0,1 mg. L<sup>-1</sup>;
- Aos 180 dias os maiores incrementos ocorreram na concentração de 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, com altura total 56,8 mm, e na concentração de 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP com altura de brotações de 45,13 mm e comprimento radicular de 10,06 mm.
- Aos 240 dias o maior desenvolvimento de brotações ocorreu na concentração 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, com 142,0 mm em altura total, 92,0 mm em parte aérea e 50 mm em raiz;
- Aos 180 dias, houve maior enraizamento *in vitro* (34,14%) das brotações na concentração de 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de BAP. Aos 240 dias observou-se maior formação de raízes adventícias *ex vitro* (63,15%) em brotações tratadas com 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP.

## Referências bibliográficas

AHMAD, A.; AHMAD, N.; ANIS, M.; et al. Gibberellic acid and thidiazuron promote micropropagation of an endangered woody tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using *in vitro* seedlings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (PCTOC), n. 0123456789, 2020. Springer Netherlands.

AHMAD, N.; FAISAL, M. Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator. **Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator**, n. March, p.491, 2018.

AHMAD, W.; ZAHIR, A.; NADEEM, M.; et al. Thidiazuron-induced efficient biosynthesis of phenolic compounds in callus culture of *Ipomoea turbinata* Lagasca and Segura. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 55, p. 710–719, 2019. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.

ALBINO, B. E. S.; CANATTO, R. A.; CRDEIRO, A. T.; FUKUSHIMA, C. H.; PILON, A. M. Propagação *In Vitro* De Jequitibá-Branco (*Cariniana estrellensis*): Uma Alternativa Para Programas De Reflorestamento. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 13, n. 2, p. 88–99, 2019.

ALVES, E. C. S. D. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 421–430, 2004.

AMIRI, S.; PANAHI, B.; MOHAMMADI, R.; FATTAHI, F. Effect of Plant Growth Regulator Combination on Direct *In Vitro* Regeneration of Persian Lilac (*Melia azedarach* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, India Section B: Biological Sciences, v. 90, n. 2, p. 261–265, 2020. Springer India.

ANDRADE, R. S.; NAVROSKI, M. C.; PEREIRA, M. DE O.; SÁ, A. C. S. Morphological and Physiological Variation in *Toona ciliata* Under Water and Salinity Stress. **Ciencia Rural**, v. 50, n. 6, 2020.

ARAGÃO, V. P. M.; RIBEIRO, Y. R. DE S.; REIS, R. S.; et al. *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 124, p. 611–620, 2016.

ARIAS, A. G.; VARGAS-CORRALES, K.; BENAVIDES-ACEVEDO, M.; et al. Morphological and biochemical changes during somatic embryogenesis in mahogany, *Swietenia macrophylla* (Meliaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 67, n. 3, 2019.

ASHOKHAN, S.; OTHMAN, R.; RAHIM, M. H. A.; KARSANI, S. A.; YAACOB, J. S. Effect of Plant Growth Regulators on Coloured Callus Formation and Accumulation of Azadirachtin, an Essential Biopesticide in *Azadirachta indica*. **Plants**, v. 352, n. 9, p. 17, 2020.

AUER, C. A. Cytokinin inhibition of *Arabidopsis* root Growth: An examination of genotype, cytokinin activity, and N6-benzyladenine metabolism. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 15, n. 4, p. 201–206, 1996. Springer New York.

BASSEGIO, C.; FOGAÇA, L. A.; BALTAZAR, P.; EMMEL, E. Desenvolvimento de ipê-roxo em meios de cultura e concentrações de bap (6- benzilaminopurna) durante a etapa de multiplicação *in vitro*. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 1, p. 72–80, 2017.

BESANI, B. K.; MATSEBATLELA, T. M.; BAGLA, V. P.; et al. Potential Antiglycation and Hypoglycaemic Effects of *Toona ciliata* M. Roem. and *Schkuhria pinnata* Lam. Thell. Crude Extracts in Differentiated C2C12 Cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 12, 2019.

BIDABADI, S. S.; JAIN, S. M. Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of *In Vitro* Plant Regeneration. **Plants**, v. 9, n. 702, p. 20, 2020.

BOTIN, A. A.; CARVALHO, A. D. E. Reguladores De Crescimento Na Produção De Mudas Florestais. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 13, n. 1, p. 83–96, 2015.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2015.

CHOI, J.; CHOI, D.; LEE, S.; RYU, C.; HWANG, I. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 7, p. 388–394, 2011. Elsevier Ltda.

CHIRUVELLA, K. K.; MOHAMMED, A.; GHANTA, R. G. Phenotypic aberrations during micropropagation of *Soymida febrifuga* (Roxb.) Adr. Juss. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 6, n. 1, p. 99–104, 2014.

DAQUINTA, M.; LEZCANO, Y.; CID, M.; et al. Calogénesis en meliáceas exóticas (*Khaya nyasica* Stapf y *Toona ciliata*), v. 3, n. 2, p. 123–125, 2003.

DAQUINTA, M.; LEZCANO, Y.; CID, M.; et al. *In Vitro* Morphogenesis of *Toona ciliata* and *Swietenia Hybrid*. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 89–91, 2007.

DAQUINTA, M.; LEZCANO, Y.; CID, M.; PINA, D.; RODRÍGUEZ, R. *In vitro* morphogenesis of *Toona ciliata* from young leaf rachis using thidiazuron. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. VIII, n. 2, p. 5–9, 2005.

DEWIR, Y. H.; NURMANSYAH; NAIDOO, Y.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 11, p. 1451–1470, 2018. Springer Berlin Heidelberg.

DINANI, E. T.; SHUKLA, M. R.; TURI, C. E.; SULLIVAN, J. A. Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator. Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator, n. March, p. 1–491, 2018.

DUAN, D.; CHEN, L.; YANG, X.; TU, Y.; JIAO, S. Antidepressant-like effect of essential oil isolated from *Toona ciliata* Roem. var. *yunnanensis*. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, n. 2, p. 191–197, 2015.

Equipe Estatcamp. Software Action. Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. URL <http://www.portalaction.com.br/>. 2014.

FAGAN, E. B.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; CHALFUN JÚNIOR, A.; DOURADO NETO, D. **Fisiologia vegetal: reguladores vegetais**. 2015.

FEITOSA, L. S.; DA COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. DE F.; et al. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 370–377, 2013.

FOO, P. C.; LEE, Z. H.; CHIN, C. K.; SUBRAMANIAM, S.; CHEW, B. L. Shoot induction in white eggplant (*Solanum melongena* L. Cv. bulat putih) using 6-benzylaminopurine and kinetin. **Tropical Life Sciences Research**, v. 29, n. 2, p. 119–129, 2018. Penerbit Universiti Sains Malaysia.

FRANK, H. O.; FAVORETO, F. C.; TRUGILHO, G. A.; et al. Germinação *in vitro* de sementes de cedro australiano (*Toona ciliata*- Meliaceae), 2009.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. DE. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Springer Netherlands, 2008.

GHARARI, Z.; BAGHERI, K.; ALI, S.; DANAFAR, H. Thidiazuron induced efficient *in vitro* organogenesis and regeneration of *Scutellaria bornmuelleri*: an important medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 55, n. 2, p. 133–138, 2019.

GOELZER, A.; DÉO, T. G.; LOPES, G. B.; DAMIANI, C. R. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 2, p. 1280–1291, 2019.

GOU, H. X.; YE, J.; WANG, Y. R.; et al. The anti-inflammatory activity of toonaciliatin K against adjuvant arthritis. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

HALIZA, I.; AHMAD FAUZI, M. S.; SITI SUHAILA, A. R.; et al. *In vitro* propagation of *Khaya ivorensis* from coppiced shoots. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 26, n. 2, p. 298–301, 2014.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Hartmann & Kester's Plant Propagation Principles and Practices** Hartmann Kester Davies Geneve Eighth Edition. 2014.

HILJE, L. En busca de un enfoque preventivo para el manejo del barrenador de las meliáceas (*Hypsipyla grandella*). **Revista de Ciencias Ambientales**, v. 54, n. 2, p. 211–229, 2020.

HOU, J.; SU, P.; WANG, D.; et al. Efficient plant regeneration from *in vitro* leaves and petioles via shoot organogenesis in *Sapium sebiferum* Roxb. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (PCTOC), v. 142, n. 1, p. 143–156, 2020. Springer Netherlands.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: Mechanisms of induction and repression. **Plant Cell**, 1. set. 2013. American Society of Plant Biologists.

ISHIMORI, T.; NIIMI, Y.; HAN, D. S. Benzyladenine and low temperature promote phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of *Lilium × formolongi* “White Aga” cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 88, n. 3, p. 313–318, 2007.

KALIL FILHO, A. N.; WENDLING, I. Produção de mudas de cedro australiano. **Embrapa Florestas: Comunicado Técnico**, v. 309, p. 1–5, 2012.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2008.

KHAN, T.; ABBASI, B. H.; KHAN, M. A.; SHINWARI, Z. K. Differential Effects of Thidiazuron on Production of Anticancer Phenolic Compounds in Callus Cultures of *Fagonia indica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 1, p. 46–58, 2016.

KLIMEK- CHODACKA, M.; DARIUSZ, K.; LUKASIEWICZ, A.; et al. Effective callus induction and plant regeneration in callus and protoplast cultures of *Nigella damascena* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 143, n. 3, p. 693–707, 2020. Springer Netherlands.

KUNDAL, M.; THAKUR, S.; DHILLON, G. P. S. Evaluation of Growth Performance of Halb Sib Progenies of *Toona ciliata* M. Roem Under Field Conditions. **Genetika**, v. 52, n. 2, p. 651–660, 2020.

LANDA, F. D. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. DE O.; BUENO FILLHO, J. S. DE S. Indução *In Vitro* De Calos Em Explantes Foliareos De Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciências Agrotécnicas**, v. 24, n. Edição Especial, p. 56–63, 2000.

LEMES, P. G.; ZANUNCIO, A. J. V.; OLIVEIRA, L. S. DE; et al. *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) Boring *Khaya ivorensis* (Meliaceae) Fruits and Seeds in Brazil: First Report. **Florida Entomologist**, v. 102, n. 1, p. 266–269, 2019.

LEO, M.; MILELLA, L.; BRACA, A.; TOMMASI, N. Cedrela and Toona genera: a rich source of bioactive limonoids and triterpenoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 751–783, 2018. Springer Netherlands.

LI, P.; SHANG, Y.; ZHOU, W.; et al. Development of an efficient regeneration system for the precious and fast-growing timber tree *Toona ciliata*. **Plant Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 51–58, 2018.

LI, T.; CAI, H.; WANG, T.; et al. Plant regeneration in *Ixora chinensis* from young leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 139, n. 3, p. 605–608, 2019. Springer Netherlands.

LIAO, D.; WU, J.; SHU, Y.; et al. Tissue Culture of *Toona ciliata*. **Agricultural Science & Technology**, v. 096, p. 2185–2187, 2017.



- LUCCHESI, J. R.; LAZAROTTO, M.; FIOR, C. S.; DE SÁ, L. C.; BROSE, C. B. Analysis of seed vigor and germination of *Toona ciliata* M. Roem. var. australis. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 4, p. 388–395, 2018.
- MAESTRI, M. P.; GABRIELA, M.; AQUINO, C. DE. A Praga Do Mogno Brasileiro: *Hypsipyla grandella* Zeller. **Biodiversidade**, v. 19, n. 3, p. 24–39, 2020.
- MARTINS, J. P. R.; SANTOS, E. R.; RODRIGUES, L. C. A.; GONTIJO, A. B. P. L.; FALQUETO, A. R. Effects of 6-benzylaminopurine on photosystem II functionality and leaf anatomy of *in vitro* cultivated *Aechmea blanchetiana*. **Biologia Plantarum**, v. 62, n. 4, p. 793–800, 2018.
- MROGINSKI, E.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. *In vitro* plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliata*, Meliaceae). **New Forests**, v. 25, p. 177–184, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 34, n. 4, p. 267–275, 1998.
- MUSIIENKO, M. M.; ZHUK, V. V.; BATSMANOVA, L. M. Signal function of cytokinin 6-benzylaminopurine in the reaction of *Triticum aestivum* L. mesophyll cells to hyperthermia. **The Ukrainian Biochemical Journal**, v. 86, n. 6, p. 66–73, 2014.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 62389, 6-Benzylaminopurine. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Benzylaminopurine>>. Acesso: jan. 2, 2021.
- NAVROSKI, M. C.; PEREIRA, M. D. O.; BORSOI, G. A.; et al. Tolerância ao frio e características silviculturais do cedro-australiano no sul do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 89, p. 47, 2017.
- NEUMANN, K.-H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture- A Tool in Biotechnology**. 2009.
- NISLER, J. TDZ-Mode of Action, Use and Potential in agriculture, In: AHMAD, N.; FAISAL, M. **Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator**. Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator, n. March, p. 1–491, 2018.
- NOVIKOVA, T. I; ZAYTSEVA, Y. G.; TDZ-Induced Morphogenesis Pathways In Woody Plant Culture, In: AHMAD, N.; FAISAL, M. **Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator**. Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator, n. March, p. 1–491, 2018.
- OLIVEIRA, J. T. DA S.; PAES, J. B. Biological Resistance of Two Reforestation Woods to Dry Wood Termites. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 4, 2019.

OLIVEIRA, K. S. DE; FREIRE, F. A. DE M.; ALOUFA, M. A. I. Influência De Reguladores De Crescimento E Do Tipo De Explante Na Morfogênese *In Vitro* De *Hancornia speciosa* Gomes. **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 6, n. 4, p. 60–74, 2019.

PAI, S. R.; DESAI, N. S. Effect of TDZ on Various Plant Cultures. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. **Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator**. Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator, n. March, p. 439–454, 2018.

RANA, MONIKA; KUMAR, S.; RANA, MEENAKSHI; DHATWALIA, V. Role of *Toona ciliata* extract in diabetes against streptozotocin – nicotinamide induced diabetic rats. **Journal of Ayurvedic and Herbal Medicie**, v. 2, n. 1, p. 6–10, 2016.

ROCHA, S. C. DA; QUOIRIN, M. Calogênese E Rizogênese Em Explantes De Mogno (*Swietenia macrophylla* King) Cultivados *In Vitro*. **Ciência Florestal, Santa Maria**, v. 14, n. 1, p. 91–101, 2004.

ROJAS-RODRÍGUEZ, F.; TORRES-CÓRDOBA, G. Árboles del Vale Central de Costa Rica: Reproducción Cedro Australiano (*Toona ciliata* M. Roem). **Revista Forestal Mesoamericana Kurú** (Costa Rica), v. 11, n. 26, 2014.

SAMPAIO, P. T. B.; JARDIM, L. S.; BLIND, A. D.; BRUNO, F. M. S. Induction of callus and adventitious shoots on epicotyl and hypocotyl segments of cumaru (*Dipteryx odorata*). **Comunicata Scientiae**, v. 9, n. 3, p. 475–480, 2018.

SANG, Y. L.; CHENG, Z. J.; ZHANG, X. S. Plant stem cells and *de novo* organogenesis. **New Phytologist**, v. 218, n. 4, p. 1334–1339, 2018.

SCHOTTZ, E. D. S.; KALIL FILHO, A. N.; TRACZ, A. L.; et al. *In vitro* multiplication of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) from juvenile shoots. **Ciencia Florestal**, v. 17, n. 2, p. 109–117, 2007.

SHEKHAWAT, M. S.; KANNAN, N.; MANOKARI, M.; RAVINDRAN, C. P. *In vitro* regeneration of shoots and *ex vitro* rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 209–214, 2015. Academy of Scientific Research and Technology.

SILVA, J. A. T. DA. Is BA (6-Benzyladenine) BAP (6-Benzylaminopurine)? The Asian and Australasian **Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 121–124, 2012.

SMITH, R. H. **Plant Tissue Culture Techniques and Experiments** 3 Ed. 2013.

SONG, H.; MAO, W.; DUAN, Z.; et al. Selection And Validation Of Reference Genes For Measuring Gene Expression In *Toona ciliata* Under Different Experimental Conditions By Quantitative Real-Time PCR Analysis. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–14, 2020. BMC Plant Biology.

SONG, H.; MAO, W.; SHANG, Y.; et al. A regeneration system using cotyledons and cotyledonary node explants of *Toona ciliata*. **Journal of Forestry Research**, 2020. Springer Berlin Heidelberg.

SUGIYAMA, M. Genetic Analysis of Plant Morphogenesis *In Vitro*. **International Review of Cytology**, v. 196, p. 67–84, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**, 6a Edição. 2017.

TAMBOSI, G.; ROGGE-RENNER, G. D. Avaliação de métodos de esterilização, concentração de ágar e composição de meio de cultura para propagação *in vitro* de *Pimpinella anisum* (Linn.) - Apiaceae. **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 31, n. 2, p. 189–194, 2010.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:Embrapa, 1998. 509 p.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. DE; CÂMARA, T. R. Clonagem vegetal. **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 86–91, 2010.

VASCONCELOS, J. N. C.; BRITO, A. L.; PINHEIRO, A. L.; et al. Stimulation of 6-benzylaminopurine and meta-topolin-induced *in vitro* shoot organogenesis and production of flavonoids of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith). **Biocatalysis ad Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 9, 2019.

ZHAN, X.; LI, P.; HUI, W.; et al. Genetic diversity and population structure of *Toona ciliata* revealed by simple sequence repeat markers. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2019. Taylor & Francis.

ZHANG, F.; WANG, J.-S.; GU, Y.-C.; KONG, L.-Y. Cytotoxic and Anti-inflammatory Triterpenoids from *Toona ciliata*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 538–546, 2012.