



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

**JOÃO VICTOR BAPTISTA SILVEIRA**

**INTRODUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Khaya grandifoliola***

Prof.<sup>a</sup> Dra. NATANE AMARAL MIRANDA  
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ  
NOVEMBRO – 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

**JOÃO VICTOR BAPTISTA SILVEIRA**

**INTRODUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Khaya grandifoliola***

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof.<sup>a</sup> Dra. NATANE AMARAL MIRANDA  
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ  
NOVEMBRO – 2023

**INTRODUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Khaya grandifoliola***

**JOÃO VICTOR BAPTISTA SILVEIRA**

APROVADA EM: 21/11/2023

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. NATANE AMARAL MIRANDA – UFRRJ  
Orientadora

---

Prof. Dr. ROGÉRIO LUIZ DA SILVA – UFRRJ  
Membro

---

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS ARTHUR JÚNIOR – UFRRJ  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a cidade de Seropédica, que apesar de suas lacunas, se tornaram lugares muito especiais, minha nova casa, de muito crescimento, aprendizagem e construção.

À Pró-reitoria de Assuntos Estudantis, que possibilitou minha permanência na graduação, através da Residência Estudantil, Restaurante Universitário e demais auxílios.

À Professora Natane Amaral Miranda, por me orientar, incentivar e instruir durante a maior parte da graduação, pelo tempo dedicado, atenção e principalmente paciência na construção deste e muitos outros trabalhos. Serei eternamente grato, muito obrigado!

À banca avaliadora deste trabalho, por aceitar nosso convite e auxiliar na construção do mesmo.

À todos membros que passaram pelo Laboratório de Recursos Genéticos Florestais (Laborgen), do Núcleo de Biotecnologia Florestal (NBF) do Departamento de Silvicultura, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pelas experiências e trocas.

À professora Marilene Hilma do Santos, pelo auxílio, incentivo e orientação acadêmica.

Sou grato a minha família e amigos, em especial meus pais, irmão, avós e meu companheiro Lucas Gomes Dias Silva, por todo investimento, tempo, amor e dedicação. Sem vocês não seria possível, obrigado por acreditarem, confiarem e me incentivarem.

Ao alojamento estudantil, em especial ao quarto M3-325 e todos seus moradores, que possibilitaram um crescimento pessoal, estudantil e profissional. Obrigado pelas trocas, experiências e amizades.

À todas as amigas construídas ao longo desta trajetória, que permitiram tornar o caminho mais leve e alegre, muito obrigado!

Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo incentivo e apoio financeiro, possibilitando meu crescimento profissional e acadêmico.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver protocolos para a desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de *Khaya grandifoliola*. Para desinfestação das sementes, avaliou-se a retirada de tegumento antes da desinfestação, a retirada posterior à desinfestação e a não retirada do tegumento. Na etapa de desinfestação das sementes avaliou-se também o efeito das concentrações 2,5 e 5,0% de hipoclorito de sódio e os tempos 5, 10, 20 e 30 minutos de imersão nessas soluções. Para avaliação da etapa de multiplicação, testou-se as concentrações de 0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP adicionado ao meio nutritivo, em diferentes tempos de cultivo, sendo as plantas avaliadas aos 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 dias após inoculação. Para a multiplicação avaliou-se também as concentrações de 0, 0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ combinado com concentrações de 0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Os resultados indicam que a retirada dos tegumentos apresenta melhores respostas na desinfestação de sementes de *Khaya grandifoliola*, assim como o uso de hipoclorito 2,5 % por cerca de 10 minutos. O cultivo *in vitro* por um período de 25 dias possibilita um melhor vigor dos tecidos. A adição de BAP ou TDZ ao meio nutritivo foi ineficaz para multiplicação *in vitro* de *Khaya grandifoliola*, todavia proporcionaram um aumento da produção de calos. Recomenda-se a investigação de demais reguladores de crescimento disponíveis no mercado, com potencial de multiplicação, bem como a continuidade de estudos na área.

**Palavras-chave:** Mogno Africano, Desinfestação, Micropropagação, Reguladores de crescimento.

## ABSTRACT

The present work aimed to develop protocols for seed disinfestation and in vitro multiplication of *Khaya grandifoliola*. For seed disinfestation, the removal of the seed coat before disinfestation, the removal after disinfestation and the non-removal of the seed coat were evaluated. In the seed disinfestation stage, the effect of 2.5 and 5.0% concentrations of sodium hypochlorite and 5, 10, 20 and 30 minutes of immersion in these solutions was also evaluated. To evaluate the multiplication stage, concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP added to the nutrient medium were tested, at different cultivation times, with the plants evaluated at 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60 days after inoculation. For multiplication, concentrations of 0, 0.01, 0.1, 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of TDZ combined with concentrations of 0 and 0.1 mg L<sup>-1</sup> of NAA were also evaluated. The results indicate that the removal of the seed coats provides better responses in the disinfestation of *Khaya grandifoliola* seeds, as does the use of 2.5% hypochlorite for around 10 minutes. In vitro cultivation for a period of 25 days allows for better tissue vigor. The addition of BAP or TDZ on the nutrient medium was ineffective for in vitro multiplication of *Khaya grandifoliola*, however they provided an increase in callus production. It is recommended to investigate other growth regulators available on the market, with potential for multiplication, as well as continuing studies in the area.

**Keywords:** African mahogany, Disinfestation, Micropropagation, Growth regulators.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
<b>2.1. <i>Khaya grandifoliola</i></b> .....	2
<b>2.2. Propagação Vegetativa</b> .....	4
<b>2.3. Micropropagação</b> .....	5
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	6
<b>3.1. Local de estudo, material vegetal e condições de cultivo</b> .....	6
<b>3.2. Desinfestação e germinação: retirada de tegumento</b> .....	7
<b>3.3. Desinfestação e germinação: Concentração de hipoclorito de sódio e tempo de imersão</b> .....	8
<b>3.4. Multiplicação: BAP e tempo de cultivo</b> .....	8
<b>3.5. Multiplicação: Citocinina x Auxina (TDZ e ANA)</b> .....	9
<b>3.6. Coleta e análise de dados</b> .....	9
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	10
<b>4.1. Desinfestação e germinação: retirada de tegumento</b> .....	10
<b>4.2. Desinfestação e germinação: Concentração de hipoclorito de sódio e tempo de imersão</b> .....	12
<b>4.3. Multiplicação: BAP e tempo de cultivo</b> .....	16
<b>4.4. Multiplicação: Citocinina x Auxina (TDZ e ANA)</b> .....	21
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	25
<b>6. REPEFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	25

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Khaya* representa um grupo de espécies arbóreas exóticas conhecidas popularmente no território brasileiro como mogno africano (Ferraz Filho *et al.*, 2021), as quais apresentam cultivos recentes em altas taxas de crescimento, com estimativa de que a área plantada em território brasileiro já tenha alcançado, em 2021, 50 mil hectares (Ribeiro; Ferraz Filho; Scolforo, 2017). Com a demanda crescente de produtos de origem florestal, para os mais variados usos, o plantio de espécies do gênero *Khaya* pode representar uma alternativa no mercado florestal, uma vez que vem ganhando espaço nos diferentes locais do mundo. Ribeiro *et al.* (2018) apontaram a viabilidade financeira na condução de um plantio de mogno-africano sob diferentes perspectivas de manejo florestal, obtendo probabilidades de sucesso muito elevadas e altas taxas internas de retorno (14 a 25%), superiores à maioria das disponíveis no mercado.

Uma das espécies do gênero *Khaya* que apresenta grande uso e importância é a *Khaya grandifoliola*, pertencente à família botânica Meliaceae e conhecida popularmente como mogno africano ou mogno-da-folha-grande, destaca-se pela madeira de alto valor agregado e ampla utilização, especialmente para movelaria e construção civil (Opuni-Frimpong, 2008). Nativa do continente Africano, estendendo-se do leste da Guiné até o Sudão e Uganda, pode atingir 45 m de altura e 23 m de fuste sem ramificações, é caducifólia, com germinação do tipo hipógea e possui sementes aladas (Bouka-Dipelet *et al.* 2019; Opuni-Frimpong, 2008; Praciak *et al.*, 2013).

Devido ao elevado potencial de crescimento do mogno-africano e obtenção de produtos de alto valor agregado, a produção uniforme de mudas de alta qualidade torna-se essencial para o atendimento deste mercado. Alguns aspectos podem limitar o cultivo da espécie, destacando-se a dificuldade de produção de mudas devido a ausência de fornecimento contínuo de sementes, perda de viabilidade das sementes em curtos períodos e o seu elevado preço, fazendo com que a produção de sementes não atenda a demanda do mercado (Pinheiro *et al.*, 2011). Assim, a propagação vegetativa constitui uma alternativa importante para contornar dificuldades encontradas no processo convencional de produção de mudas, tornando-se, uma alternativa viável para a propagação de plantas que apresentam dificuldades na propagação



natural e baixo poder germinativo (Hartmann *et al.*, 2014). Dentre as técnicas de propagação vegetativa de espécies florestais, a micropropagação encontra-se entre as principais.

A micropropagação tem sido utilizada na área florestal com diferentes finalidades, como preservação de germoplasma, multiplicação de plantas selecionadas, rejuvenescimento e limpeza clonal (Xavier; Wendling; Silva, 2013). Permitindo a produção de um material homogêneo e uniforme, livre de patógenos, vigoroso, em larga escala, em tempo e espaço reduzidos (Trueman; Hung; Wendling, 2018). Neste processo, vários fatores são responsáveis pelo desenvolvimento e resposta morfogênica das plantas *in vitro*, como a composição do meio nutritivo, os reguladores de crescimento utilizados e as condições da sala de cultivo em que as plantas são mantidas.

Conhecimento sobre aspectos que afetam a resposta vegetal no cultivo *in vitro* é escasso para muitas espécies. Há carência de estudos que abordem vários dos fatores envolvidos na propagação vegetativa, sendo necessário o desenvolvimento de protocolos mais eficientes, que viabilizem a produção de mudas em larga escala. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos o desenvolvimento de protocolos para a introdução *in vitro* de sementes de *Khaya grandifoliola*, bem como a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais em diferentes concentrações hormonais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. *Khaya grandifoliola***

Durante o período de 1990 a 2017, apesar da área florestal global ter diminuído aproximadamente 3,0%, a área mundial de florestas plantadas aumentou cerca de 64,0%, e a demanda global por madeira em tora para diferentes fins industriais aumentou aproximadamente 37,0% (Morland *et al.*, 2018). No Brasil, os cultivos de mogno-africano apesar de recentes, com suas primeiras plantações iniciando-se aproximadamente em 1999, têm crescido de forma significativa nos últimos anos, estima-se que a área plantada em território brasileiro já havia ultrapassado 50 mil hectares em 2021, predominantemente composta por *Khaya grandifoliola* e *Khaya senegalensis* (Ferraz Filho *et al.*, 2021; Ribeiro; Ferraz Filho;

Scolforo, 2017). Apresentando uma boa adaptação ao território, em especial ao Cerrado, além de alto valor econômico, representando um bom investimento, permitindo taxas internas de retorno máximas de 25%, além dos benefícios ambientais, como proteção de remanescentes e sequestro de carbono (Campello; Coelho, 2023; Ribeiro *et al.* 2018).

O gênero *Khaya*, representa um grupo espécies arbóreas exóticas de elevado potencial madeireiro, conhecidas popularmente no território brasileiro como mogno africano, de origem africana pertencente à família botânica Meliaceae, destacado-se *Khaya anthotheca* (Welw.) C. DC., *Khaya grandifoliola* C. DC., *Khaya ivorensis* A. Chev. E *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. (Reis; Oliveira; Santos, 2019; Ribeiro; Ferraz Filho; Scolforo, 2017). A madeira do mogno africano também é reconhecida pelas características favoráveis ao uso moveleiro de alto valor agregado, assim como os produtos florestais não-madeireiros que são bastante explorados, como a utilização da casca e folhas na produção de biofármacos (Sousa; Barreira, 2022).

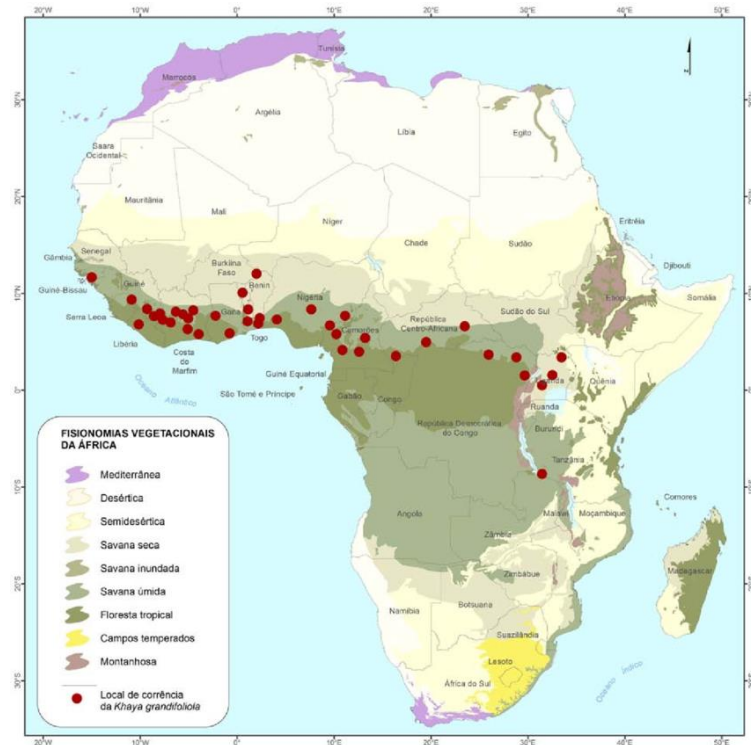
*Khaya grandifoliola* é conhecida popularmente como mogno-da-folha-grande, possui uma madeira muito valorizada, de ampla utilização, como carpintaria, movelaria, e laminação, construção civil e naval (Opuni-Frimpong, 2008). Destaca-se também seus usos etnomedicinais, em seus locais naturais, como a utilização do extrato da casca do fuste no tratamento da malária (Guy-Armand *et al.*, 2023; Onohuean *et al.*, 2021), além de outras aplicações biomédicas e farmacológicas (Akinyelu *et al.*, 2023; Nurain; Bewaji, 2017; Owona *et al.*, 2022).

Nativa do continente Africano, ocorre naturalmente desde a República de Guiné, na costa oeste da África, até o Sudão e Uganda, ao leste (Figura 1) (Opuni-Frimpong, 2008). Encontrada principalmente em Floresta Semidecidual, de ocorrência ao longo dos cursos d'água quando nos tipos secos e Savana, encontrando-se também em partes rochosas e montanhosas de Floresta Semidecídua Úmida e florestas de galeria (Bouka-Dipelet *et al.* 2019; Opuni-Frimpong *et al.*, 2016; Praciak *et al.*, 2013).

Apresenta porte de médio a alto, podendo atingir 45 m de altura, com diâmetro de cerca de 150 cm e os fustes podem atingir 23 m, sem ramificações, podendo apresentar sapopemas de até 3 m de altura, sendo uma espécie do tipo caducifólia (Bouka-Dipelet *et al.* 2019; Praciak *et al.*, 2013). A propagação seminífera é a principal forma utilizada para produção de mudas da

espécie, que possui sementes altamente atacadas por insetos e quando novas apresentam elevadas taxas de germinação, cerca de 90%, todavia perdem sua viabilidade rapidamente, cerca de 2 meses em condições naturais (Opuni-Frimpong, 2008).

Assim, há dificuldades de produção de suas mudas, visto que a produção de sementes não atende a demanda do mercado, e tais dificuldades estão relacionadas à falta de fornecimento contínuo das sementes; o difícil processo de coletas devido ao seu porte e irregularidade; a perda de viabilidade em pequeno espaço de tempo; e o elevado preço das sementes (Pinheiro *et al.*, 2011). Desta forma, a propagação vegetativa é apontada como ferramenta auxiliar na produção de mudas da espécie.



**Figura 1.** Área de ocorrência natural de *Khaya grandifoliola* no continente Africano. Fonte: Reis, Oliveira e Santos (2019).

## 2.2. Propagação Vegetativa

A propagação vegetativa, também conhecida como propagação assexuada ou clonagem, consiste na produção de mudas ou novas plantas a partir de partes ou órgãos vegetativos da planta (ramos, gemas, estacas, folhas, raízes e outros), ou seja, consiste em um processo que

não há recombinação gênica, permitindo a produção de plantas selecionadas em grande quantidade, geneticamente idênticas à planta fornecedora de propágulo (Hartmann *et al.*, 2014; Wendling; Dutra; Grossi, 2006). É um processo de multiplicação que ocorre através de mecanismos de divisão e diferenciação celular, por meio da regeneração de partes da planta-mãe (Fachinello; Hoffmann; Nachtigal, 2005).

As técnicas de propagação vegetativa constituem-se em um dos principais processos de produção de mudas, possibilitando a perpetuação de importantes ganhos genéticos obtidos em programas de melhoramento, destacando-se quatro métodos principais: enxertia, mergulhia, estaquia e propagação *in vitro* (Dias *et al.*, 2005; Xavier; Wendling; Silva, 2013). Existem importantes vantagens associadas a esses métodos, como a obtenção plantas homogêneas, possibilitando uma uniformidade de plantios, maior controle sobre a qualidade de seus produtos, bem como o aproveitamento de combinações genéticas variadas (Xavier; Wendling; Silva, 2013). Por sua vez, pode apresentar como desvantagens, plantas com menor longevidade, sistema radicular menos desenvolvido, além do aumento de riscos aos aspectos fitossanitários, devido à homogeneidade da população clonal (Dias *et al.*, 2005).

Desta forma, o uso da clonagem de espécies florestais em larga escala tem grande potencial no aumento da produtividade, através da adoção da silvicultura clonal, utilizando de indivíduos superiores (Assis; Reis, 2023). No território brasileiro, destaca-se o uso da clonagem para alguns gêneros e espécies, sendo a silvicultura clonal em *Eucalyptus* uma das mais evoluídas e estabelecidas, apresentando excelentes resultados principalmente com a estaquia, bem como a enxertia na heveicultura permitindo a redução de doenças, aumento de produtividade de látex e adaptação local (Xavier; Wendling; Silva, 2013). Em *Khaya grandifoliola* já foram relatados resultados interessantes com os de Azevedo *et al.* (2021) que indicaram a miniestaquia como uma alternativa viável para a propagação da espécie, utilizando-se como propágulos as partes apicais de brotos oriundos de minicepas cultivadas em viveiro, com melhoria do enraizamento pelo uso do ácido indólbutírico na concentração de 2000 mg L<sup>-1</sup>. Também já foi relatada a influência do substrato no enraizamento de estacas da espécie, indicando ser possível a produção de mudas de qualidade via estaquia (Opoku *et al.*, 2022)

### **2.3. Micropropagação**

A cultura de tecidos vegetais é uma importante técnica que permite cultivar células, tecidos e órgãos vegetais, em condições controladas e assépticas, possibilitando a multiplicação de células, tecidos e órgãos em larga escala, de forma rápida e uniforme (Akin-Idowu *et al.*, 2009; Rai *et al.*, 2022). Representa uma importante ferramenta biotecnológica que pode agregar valor e contribuir para a expansão, valorização e conservação de plantas (Santos *et al.*, 2021), na qual destaca-se a micropropagação como uma importante área da cultura de tecidos aplicada no setor florestal.

A Micropropagação é um importante método da cultura de tecidos utilizado para propagação clonal de plantas em larga escala e em curto período de tempo, de forma controlada, permitindo a propagação em massa de clones específicos, produção contínua de plantas livres de patógenos, bem como a preservação de germoplasma (Hartmann *et al.*, 2014; Trueman; Hung; Wendling, 2018). A micropropagação se fundamenta essencialmente em quatro estágios principais, (1) Estabelecimento, entrada dos propágulos no cultivo *in vitro*; (2) Multiplicação, aumento das brotações; (3) Enraizamento; (4) Aclimatização, mudança gradual das plantas para condições ao ar livre (Hartmann *et al.*, 2014). Sendo estes fundamentais para uma produção vegetal eficiente, vigorosa e que possa se perpetuar.

Com relação à micropropagação de espécies florestais, tem um elevado potencial de aplicação, permitindo a propagação clonal em larga escala, seleção de genótipos e rejuvenescimento clonal, contribuindo para fornecer clones superiores e livres de patógenos, podendo também ser empregada em lenhosas de difícil propagação (Trueman; Hung; Wendling, 2018; Yasodha; Sumathi, 2004). Entretanto, é evidente a carência de trabalhos de propagação *in vitro* para espécies lenhosas, restringindo-se a poucas espécies e gêneros de maior interesse.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local de estudo, material vegetal e condições de cultivo**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos Florestais (Laborgen) do Núcleo de Biotecnologia Florestal (NBF), do Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ.

As sementes foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia Reprodutiva e Conservação de Espécies Arbóreas (LACON), do Instituto de Florestas da UFRRJ. Após a instalação dos testes, as plantas foram mantidas em sala de cultura com temperatura ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (16h) controlados, até a sua avaliação.

### 3.2. Desinfestação e germinação: retirada de tegumento

Testou-se o efeito da retirada do tegumento das sementes de *Khaya grandifoliola* (Figura 2) na sua desinfestação e germinação, sendo avaliadas 3 metodologias: retirada manual do tegumento antes de sua desinfestação (T1); retirada do tegumento com auxílio de pinças, em câmara de fluxo laminar após sua desinfestação (T2); uso da semente inteira (com tegumento) (T3).



**Figura 2.** Sementes de *Khaya grandifoliola* sem e com tegumento, respectivamente da esquerda para direita.

Em câmara de fluxo laminar, realizou-se a assepsia das sementes em solução de hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ) na concentração de 2,5% acrescida de 4 gotas de Tween-20 para cada 100 mL de solução, por 20 minutos sob agitação constante, com posterior lavagem das sementes em água destilada e autoclavada. As mesmas foram inoculadas individualmente em frascos contendo 30 mL de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) previamente

preparado e autoclavado, acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de polivinil pirrolidona (PVP), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,3 g L<sup>-1</sup> de phytigel, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos, 6 repetições, com cada repetição composta por 4 frascos contendo uma semente cada.

### **3.3. Desinfestação e germinação: Concentração de hipoclorito de sódio e tempo de imersão**

Foi realizada a retirada dos tegumentos das sementes de *Khaya grandifoliola* manualmente antes da desinfestação. Em câmara de fluxo laminar, realizou-se a assepsia das sementes em solução de hipoclorito de sódio nas concentrações de 2,5 e 5,0% acrescidas de 4 gotas de Tween-20 a cada 100 mL de solução, onde permaneceram por 5, 10, 20 e 30 minutos sob agitação constante, com posterior lavagem das sementes em água destilada e autoclavada. As mesmas foram inoculadas individualmente em frascos contendo 30 mL de meio de cultura MS previamente preparado e autoclavado, acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4, sendo 2 concentrações de hipoclorito de sódio e 4 tempos de imersão, com 5 repetições e 3 frascos por repetição, contendo uma semente por frasco de cultivo.

### **3.4. Multiplicação: BAP e tempo de cultivo**

Plantas germinadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Em câmara de fluxo laminar, segmentos nodais apresentando entre 2 e 3 cm foram retirados das plantas e inoculados individualmente em frascos contendo 30 mL de meio de cultura MS previamente preparado e autoclavado, acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, BAP nas concentrações 0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA), além de 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, com pH do meio ajustado para 5,7 ± 0,1.

O experimento foi avaliado dos 25 aos 60 dias, em intervalos de 5 dias. Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida, organizados em 5

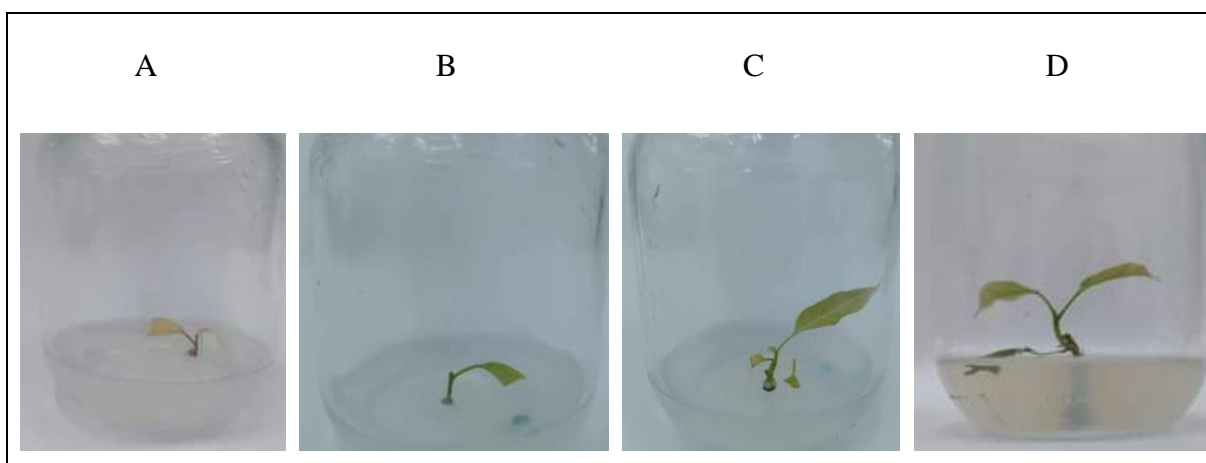
tratamentos (concentrações de BAP), 8 subparcelas, 4 repetições com 4 frascos por repetição, sendo um explante por frasco de cultivo.

### 3.5. Multiplicação: Citocinina x Auxina (TDZ e ANA)

Seguindo o mesmo protocolo para a multiplicação com BAP, testou-se thidiazuron (TDZ) nas concentrações 0, 0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> e ANA nas concentrações 0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2, sendo 5 concentrações de TDZ e 2 de ANA, com 5 repetições e 3 frascos por repetição, contendo um explante por frasco de cultivo.

### 3.6. Coleta e análise de dados

Para os experimentos de desinfestação e germinação, após 30 dias de cultivo, avaliou-se a taxa de contaminação, germinação e número de plântulas normais. Para o teste de multiplicação testando-se BAP e tempo de cultivo, avaliou-se dos 25 aos 60 dias em intervalos de 5 dias, o número de gemas, tamanho dos calos e o vigor das plantas em escala de 0 a 3, onde 0 – morto, 1 – ruim, 2 – bom e 3 – ótimo (Figura 3). Para o TDZ, avaliou-se as variáveis mencionadas para o teste com BAP, adicionando também avaliação sobre o número e tamanho médio das brotações emitidas.



**Figura 3.** Classificação de vigor das plantas de *Khaya grandifoliola* em experimento de uso do BAP aos 45 dias de cultivo, variando entre morto (A), ruim (B), bom (C) e ótimo (D).



Para análise de variância foi testada a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste Bartlett. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância e de regressão polinomial utilizando o software R versão 4.2.3 (R Core Team, 2023) e o pacote ExpDes (Ferreira *et al.*, 2014).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Desinfestação e germinação: retirada de tegumento

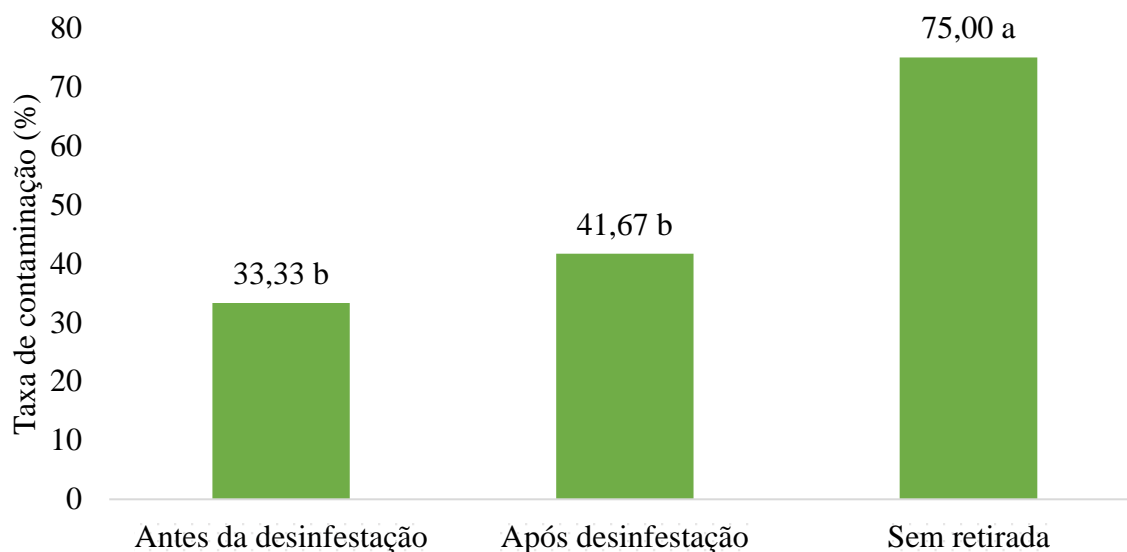
A taxa de contaminação foi influenciada pelos tratamentos de retirada de tegumento das sementes de *Khaya grandifoliola* (Tabela 1). Enquanto para as variáveis germinação e número de plântulas normais, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos testados ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Resultado da análise de variância para a taxa de contaminação, germinação e número de plântulas normais, a partir de sementes de *Khaya grandifoliola* inoculadas *in vitro* em função da retirada de tegumento, 30 dias após a inoculação.

VARIÁVEL	P	CV (%)
Contaminação	0,00896*	42,16
Germinação	0,4462 <sup>ns</sup>	50,97
Plântulas Normais	0,4862 <sup>ns</sup>	57,94

CV: Coeficiente de Variação; P: probabilidade do valor P; \*:  $p < 0,05$ ; ns:  $p \geq 0,05$ .

A retirada do tegumento, seja antes ou após a desinfestação, foi fator importante para diminuição da taxa de contaminação. O procedimento que proporcionou maior taxa de contaminação foi aquele onde a semente utilizada foi desinfestada e inoculada contendo o tegumento (Figura 4). As taxas de contaminação nos tratamentos com retirada do tegumento antes ou após a desinfestação foram significativamente iguais e inferiores àquele sem a retirada, com média de 33,33% e 41,67%, respectivamente. Apesar de serem estatisticamente iguais, considerando a dificuldade de retirada do tegumento com o uso das pinças em câmara de fluxo laminar, e o possível aumento de perdas de sementes devido a quebras e lesões neste sistema, destaca-se a metodologia com a retirada prévia do tegumento da semente como a mais recomendada para o estabelecimento *in vitro* da espécie.



**Figura 4.** Valores médios de contaminação sob diferentes métodos de retirada de tegumento, a partir de sementes de *Khaya grandifoliola* inoculadas *in vitro* em função da retirada de tegumento, 30 dias após a inoculação. Médias seguidas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade.

A presença do tegumento pode afetar diretamente o processo de germinação, atuando como uma barreira física, dificultando as trocas gasosas e entrada de água, reduzindo assim, os níveis de desenvolvimento do embrião, influenciando o direcionamento da radícula e até a ocorrência de danos e deformações (Galeriani; Cosmo, 2020; Guedes *et al.*, 2023; Silva; Carvalho, 2020). Sua retirada em algumas espécies, pode promover maior porcentagem e índice de velocidade de germinação, bem como uma homogeneidade de germinação (Dias; Freire, 2017; Guedes *et al.*, 2023).

A impermeabilidade do revestimento da semente pode estar diretamente associada aos aspectos estruturais que o tegumento apresenta formando uma barreira entre o embrião e o meio externo, podendo influenciar diretamente a germinação (Alves Junior *et al.*, 2016). Juntamente, é fundamental destacar que o tegumento representa o tecido das sementes com contato direto com o ambiente externo, e conseqüentemente há contaminantes presentes no solo e ar. Por ser a parte mais externa da semente, possivelmente sua retirada representa também a retirada de grande parte dos contaminantes e impurezas que poderiam dificultar a desinfestação do material para introdução *in vitro*.

Apesar de não apresentar diferenças significativas a taxa de germinação foi de 90,28% para a retirada do tegumento após a desinfestação, 73,61% retirada do tegumento antes da desinfestação e de 60% na utilização da semente intacta. Já para o número de plântulas normais foi de 66,66, 78,57 e 100% para os tratamentos com retirada do tegumento após a desinfestação, retirada do tegumento antes da desinfestação e na utilização da semente sem retirar o tegumento, respectivamente.

Salvador (2020) ao estudar o efeito do tegumento no desenvolvimento de plântulas de *Myrciaria floribunda*, constatou que sua ausência proporcionou taxas superiores de crescimento, vigor e desenvolvimento. Oliveira Júnior (2021) também encontrou respostas similares para *Eugenia involucrata* DC. na qual sua retirada, permitiu melhores taxas de germinação, formação de parte aérea, comprimento e formação de gemas.

No entanto, a retirada do tegumento é uma atividade onerosa e delicada, uma vez que, durante o processo, pode-se causar ferimentos aos meristemas localizados nas duas extremidades das sementes, podendo prejudicar sua capacidade germinativa, além disso qualquer dano pode facilitar o ataque de microrganismos patogênicos e seu apodrecimento (Guedes *et al.*, 2023; Marteninghi, 2017).

Em contraposição a esses trabalhos, para *Khaya grandifoliola* não foram observadas diferenças significativas para a germinação e número de plantas normais, todavia a taxa de contaminação foi inferior com a retirada dos tegumentos, sendo o seu controle fundamental para o sucesso do estabelecimento *in vitro*. Desta forma, para a desinfestação e estabelecimento *in vitro* de sementes de *Khaya grandifoliola* recomenda-se a retirada prévia do tegumento.

#### **4.2. Desinfestação e germinação: Concentração de hipoclorito de sódio e tempo de imersão**

Ao avaliar a taxa de contaminação, observou-se efeito da interação entre a concentração do hipoclorito e o tempo de imersão ( $p < 0,05$ ). A variável número de plântulas normais foi influenciada apenas pelo fator concentração de hipoclorito. A germinação não sofreu influência dos fatores testados (Tabela 2).

Avaliando os desdobramentos dos fatores, para a variável contaminação, observou-se que quando as sementes foram imersas por 30 minutos, o fator concentração foi significativo. Os resultados indicam que, ao empregar a metodologia de imersão em hipoclorito por 30 minutos, utilizar a concentração de 2,5% proporciona menor contaminação das sementes *in vitro* (Tabela 3).

**Tabela 2.** Resultado da análise de variância para a taxa de germinação, contaminação e número de plântulas normais, a partir de sementes de *Khaya grandifoliola* inoculadas *in vitro* em função da concentração de hipoclorito de sódio e tempos de imersão, 30 dias após a inoculação.

Variável	P			
	Concentração	Tempo	Concentração x Tempo	CV (%)
Contaminação	0,6091 <sup>ns</sup>	5,0 x 10 <sup>-5*</sup>	0,0400*	68,04
Germinação	0,0837 <sup>ns</sup>	0,0789 <sup>ns</sup>	0,7486 <sup>ns</sup>	62,20
Plântulas normais	0,0460*	0,6639 <sup>ns</sup>	0,1644 <sup>ns</sup>	101,80

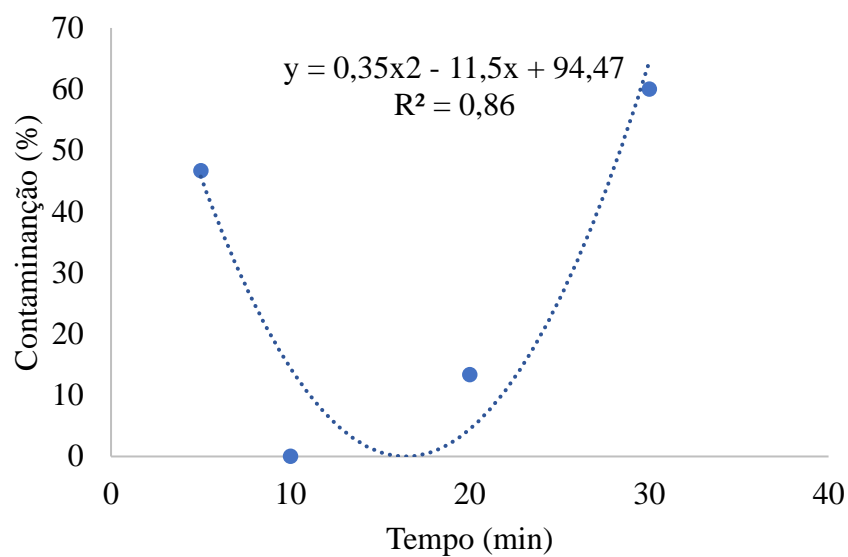
CV: Coeficiente de Variação; P: probabilidade do valor P; \*:  $p < 0,05$ ; ns:  $p \geq 0,05$ .

**Tabela 3.** Valores médios de contaminação de sementes de *Khaya grandifoliola* inoculadas *in vitro* em função de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e diferentes tempos de imersão.

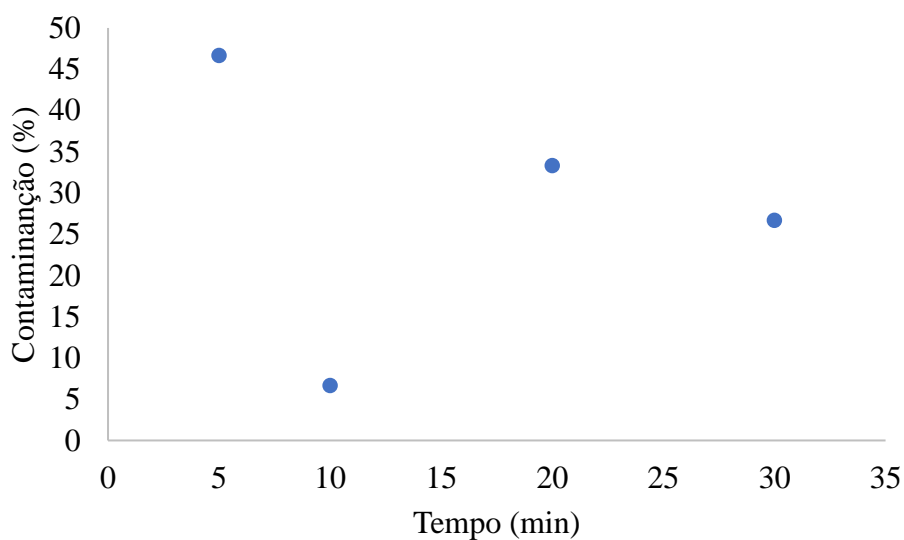
Concentração (%)	Tempo (min)			
	5	10	20	30
2,5	46,67 a	6,67 a	33,33 a	26,67 b
5,0	53,33 a	0,00 a	13,33 a	60,00 a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade.

Quando se avaliou o tempo dentro de cada concentração de hipoclorito usada, foi observado efeito quadrático da contaminação em relação ao tempo de imersão, quando utilizou-se hipoclorito de sódio 5% (Figura 5). Para a concentração de hipoclorito 2,5%, não houve ajuste de regressão para os dados (Figura 6).



**Figura 5.** Modelo polinomial quadrático para contaminação em função do tempo de imersão hipoclorito de sódio 5% de semente de *Khaya grandifoliola*, aos 30 dias de cultivo, via curva de regressão ajustada.



**Figura 6.** Dados médios para taxa de contaminação em função do tempo de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% de sementes de *Khaya grandifoliola*, aos 30 dias de cultivo.

O tempo de imersão de sementes de *Khaya grandifoliola* em hipoclorito de sódio, foi um fator determinante em sua descontaminação, e a utilização da concentração de 5% permitiu um ponto ótimo (mínimo de contaminação) aos 16,43 minutos (~ 16 minutos), com

uma taxa estimada de 0% de contaminação (Figura 5). Por sua vez em condições de hipoclorito de sódio 2,5% apresentou menores valores médios de contaminação no tempo de 10 minutos, com uma taxa média de 6,7% de contaminação

Para a variável plântulas normais, observou-se uma média de 52,8% de plântulas normais quando foi utilizada concentração de 2,5%, sendo este valor superior à média de 23,3% obtida na concentração de 5% de hipoclorito de sódio (Tabela 4). No entanto, ao avaliar a germinação, não foi observada influência dos fatores testados, sendo os valores médios de germinação de 64,2% e 45,0% para as concentrações de hipoclorito 2,5 e 5%, respectivamente. Em relação aos tempos de imersão, as médias de germinação foram de 76,7%, 45,0%, 58,3% e 38,3% para os tempos 5, 10, 20 e 30 minutos, respectivamente.

**Tabela 4.** Valores médios de número de plântulas normais de sementes de *Khaya grandifoliola* inoculadas *in vitro* em função de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

Concentração (%)	Plântulas normais (%)
2,5	52,78 a
5,0	23,33 b

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade.

Entre as dificuldades no estabelecimento dos vegetais *in vitro* está a relação direta com a presença de microrganismos endógenos e exógenos que influenciam na viabilidade da técnica e no desenvolvimento do material vegetativo (Lozano; Guerrero; López, 2015). A contaminação pode ser responsável pelo insucesso da implantação de culturas *in vitro*, no qual a desinfestação do material vegetal propagado é frequentemente realizada pela destruição química dos microrganismos por meio de compostos esterilizantes como álcool, hipoclorito de sódio, fungicidas e ácido sulfúrico (Pasqual *et al.* 2012). Utilizar componentes de amplo espectro de ação e que também sejam pouco tóxico às culturas nas concentrações necessárias para controlar microrganismos é fundamental para o sucesso desta etapa (Pasqual *et al.*, 2012).

O tipo de substância a ser utilizada na desinfestação de explantes, sua concentração e tempo de exposição são alguns dos fatores de grande importância no estabelecimento de uma

cultura *in vitro*, uma vez que essas soluções desinfestantes podem também ocasionar injúrias e estresse no material vegetal (Taiz; Zeiger, 2013). O hipoclorito de sódio é uma substância desinfestante bastante usada na assepsia de sementes e explantes, sendo importante avaliar, para cada caso, a melhor concentração e tempo de exposição, visto que valores muito baixos podem acarretar altas contaminações e perdas, enquanto em situação oposta pode haver elevada mortalidade e danos nos tecidos vegetais.

A resposta aos métodos de desinfestação de sementes é variável entre diferentes espécies avaliadas, bem como para a concentração e tempos de imersão nos agentes desinfestantes. Pereira *et al.* (2021), ao avaliarem os efeitos do tempo de imersão em hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes de *Swietenia macrophylla* King, conhecida popularmente como mogno brasileiro, observou que a desinfestação das sementes deve ser realizada com imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 40 minutos. Já Marchi e Fernandes (2020) observaram em *Adenium obesum* Roem. & Schult. (Forssk.), que a utilização de hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos já é suficiente e eficiente na assepsia das sementes.

De forma geral, a desinfestação de sementes de *Khaya grandifoliola* pode ser realizada com alta taxa de sucesso utilizando hipoclorito de sódio nas concentrações 2,5 e 5%, por tempos entre 10 e 16 minutos. No entanto, para que não haja prejuízo da formação da plântula gerada (plântula normal) recomenda-se a desinfestação das sementes de *Khaya grandifoliola*, para estabelecimento *in vitro*, utilizando solução de hipoclorito de sódio 2,5%, além da redução da concentração de cloro aplicado ao tecido e seu estresse gerado.

#### **4.3. Multiplicação: BAP e tempo de cultivo**

O vigor apresentou respostas para as concentrações de BAP, tempo de cultivo e sua interação ( $p < 0,05$ ). Já para tamanho de calos, a concentração e tempo de cultivo influenciaram, não sendo significativa a interação dos fatores ( $p \geq 0,05$ ). Enquanto para o número de gemas, apenas o tempo de cultivo apresentou diferenças significativas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resultado da análise de variância para o vigor, número de gemas e tamanho de calos, a partir de segmentos nodais de *Khaya grandifoliola* inoculados *in vitro* em função da concentração de benzilaminopurina (BAP) pelo tempo de cultivo.

Variável	P			
	BAP	Tempo	BAP x Tempo	CV (%)
Vigor	1,0 x 10 <sup>-6</sup> *	1,2 x 10 <sup>-5</sup> *	0,0014*	53,29
Número de gemas	0,3614 <sup>ns</sup>	3,5 x 10 <sup>-5</sup> *	0,3012 <sup>ns</sup>	50,64
Tamanho de calos	2,0 x 10 <sup>-16</sup> *	0,0588 <sup>ns</sup>	0,4562 <sup>ns</sup>	26,18

CV: Coeficiente de Variação; P: probabilidade do valor P; \*: p<0,05; ns: p≥0,05.

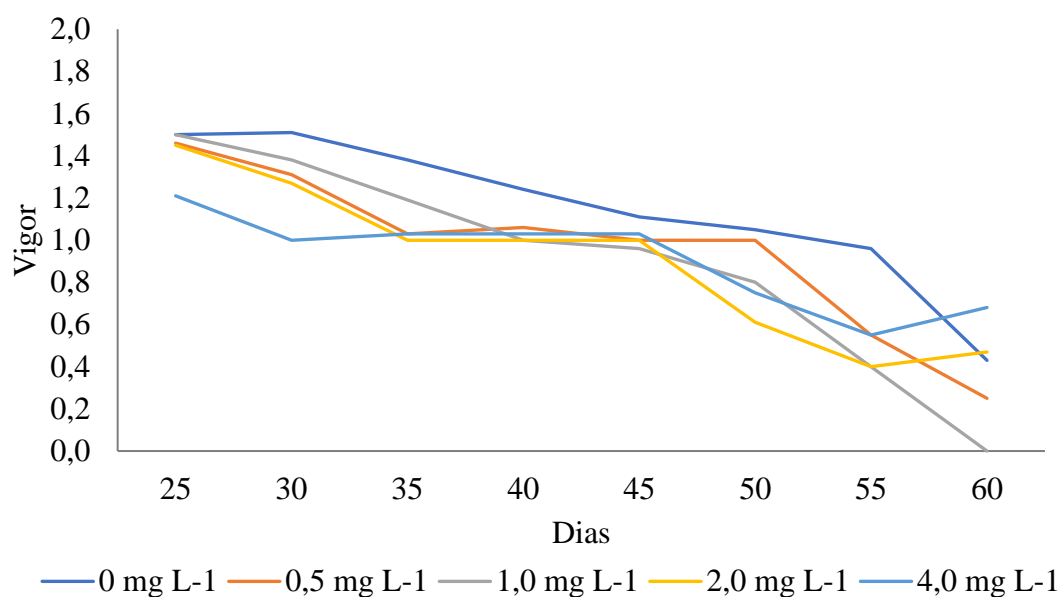
A variável vigor, de forma geral, apresentou melhores respostas dos 25 aos 45 dias de cultivo (Tabela 6 e figura 7), apesar de não diferirem significativamente entre si, apresenta maiores valores ao início do período. Já para concentração de BAP, os melhores resultados ocorrem nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP ou em sua ausência, apesar de não diferirem entre si, seu ápice ocorre em sua ausência.

**Tabela 6.** Valores médios de vigor de explantes de *Khaya grandifoliola* inoculados *in vitro* em função de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e por diferentes tempos de cultivo.

Tempo (dias)	BAP (cc)				
	0	0,5	1,0	2,0	4,0
25	1,50 A a	1,46 A a	1,50 A a	1,45 A a	1,21 A a
30	1,51 A a	1,31 A ab	1,38 AB a	1,27 A ab	1,0 AB b
35	1,38 A a	1,03 AB ab	1,19 AB ab	1,0 AB b	1,03 AB ab
40	1,24 A a	1,06 AB a	1,0 ABC a	1,0 AB a	1,03 AB a
45	1,11 A a	1,0 AB a	0,96 ABC a	1,0 AB a	1,03 AB a
50	1,05 AB a	1,0 AB a	0,80 BC ab	0,61 B b	0,75 AB ab
55	0,96 AB a	0,55 BC b	0,40 CD b	0,40 B b	0,55 B b
60	0,43 B ab	0,25 C bc	0,00 D c	0,47 B ab	0,68 AB a

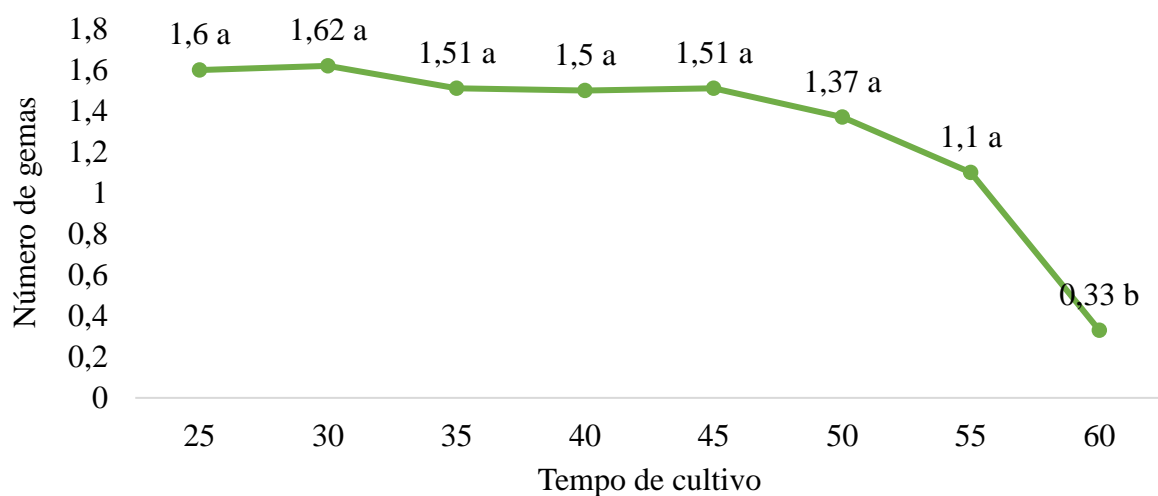
Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na coluna e letras minúsculas iguais na linha não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade.



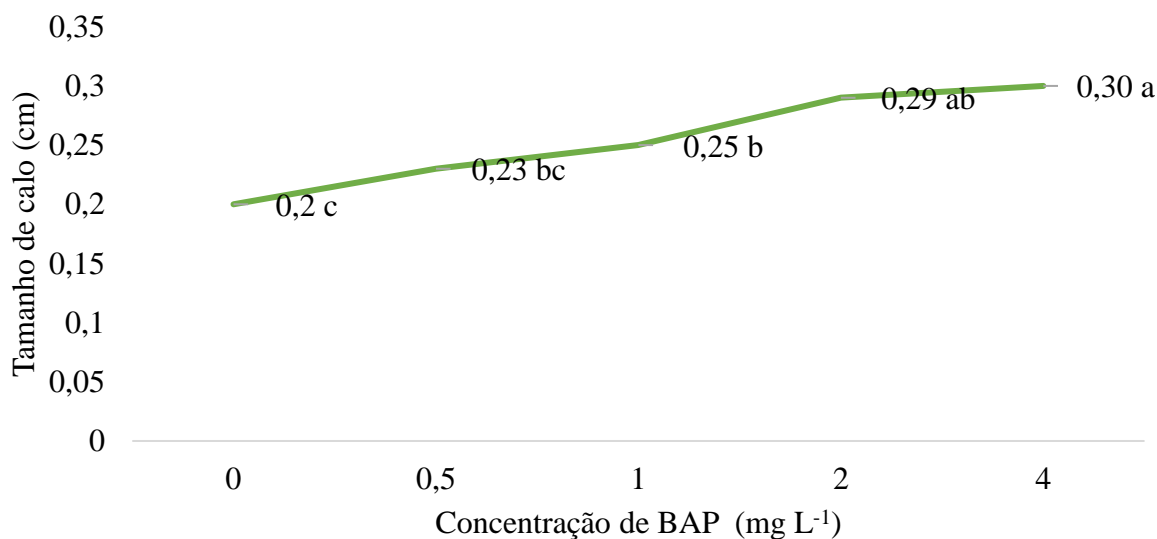


**Figura 7.** Dados médios para vigor ao longo do tempo de cultivo *in vitro* de *Khaya grandifoliola* em diferentes concentrações de BAP

Para a variável número de gemas, o cultivo *in vitro* do explante por até 55 dias proporcionou resultados superiores (Figura 8). Entretanto apesar destes não diferirem entre si, seu ponto máximo ocorre aos 30 dias, havendo um decréscimo na média com o aumento da duração do cultivo *in vitro*.



**Figura 8.** Valores médios de número de gemas por segmento nodal sob diferentes tempos de cultivo, a partir de *explantes* de *Khaya grandifoliola* multiplicados *in vitro*. Médias seguidas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade.



**Figura 9.** Valores médios de tamanho de calos sob diferentes concentrações de BAP, a partir de *explantes* de *Khaya grandifoliola* inoculados *in vitro*. Médias seguidas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade

Por sua vez para o tamanho de calos, a utilização de maiores concentrações de BAP proporcionou resultados superiores (Figura 9), desta forma a ausência do hormônio proporcionou melhores respostas, não apresentando diferenças significativas do tratamento utilizando 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Os reguladores de crescimento são componentes adicionados na cultura de tecidos para suprir as deficiências dos teores endógenos do próprio explante, estimulando respostas de interesse para diferenciação, crescimento, alongamento e multiplicação celular (Grattapaglia; Machado, 1998). Os reguladores mais utilizados são as auxinas e citocininas, com o objetivo de promover a multiplicação, alongamento e diferenciação celular, principalmente quando estes interagem (Taiz; Zeiger, 2009).

Para multiplicação *in vitro* de diversas plantas, o uso do BAP tem sido relatado frequentemente como regulador que proporciona bons resultados nesta etapa da micropropagação. Oliveira Júnior (2021) ao avaliar o uso do BAP na multiplicação de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. Encontrou que a utilização de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP possibilita a obtenção de um maior número de brotações. Já para *Cedrella odorata* L., Lameira, Cordeiro e Campelo (2020) constataram que a utilização de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP permite uma melhor indução de brotações, possibilitando maiores sucessos na etapa de multiplicação durante o cultivo *in vitro*.

Colaborando parcialmente com estes estudos, em *Khaya grandifoliola*, a ausência do BAP ou seu uso em baixas concentrações (0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) apresentaram melhores respostas para a maioria das variáveis, entretanto é importante destacar que os resultados foram considerados insuficientes para a continuidade das etapas de micropropagação da espécie, sendo importante que a fase de multiplicação seja melhor investigada.

O conhecimento sobre o tempo necessário de permanência de uma planta em uma determinada condição é fundamental para otimizar o desenvolvimento das plantas *in vitro*, permitindo uma produção em qualidade e quantidade superior, com menores perdas de tempo e recursos. O crescimento *in vitro* das culturas está diretamente relacionado ao tempo de permanência no meio de cultivo, visto que ao permanecer por um período muito reduzido, as culturas apresentam baixo desenvolvimento, apresentando geralmente apenas uma folha expandida, rizoma pouco definido, menor enraizamento com baixa iniciação de primórdios radiculares e conseqüentemente, resultando numa menor porcentagem de sobrevivência nas etapas posteriores (Costa *et al.*, 2008).

Pinheiro, Carvalho e Martins (2018), ao avaliarem o efeito do tempo nas etapas de enraizamento e alongamento de *Musa* sp., observaram que o cultivo durante um período de 35 dias permite um maior desenvolvimento das plantas. Já Santos *et al.* (2011), ao estudarem a influencia do sorbitol e sacarose pelo tempo na conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes, observaram interação entre os fatores, onde o valor do número de brotações da espécie foi crescente em função do aumento do tempo de cultivo nas menores concentrações dos açúcares, mas quando utilizou-se maiores concentrações, houve decréscimo das brotações ao longo do tempo. Similar aos resultados encontrados em *Musa* sp., por Pinheiro, Carvalho e

Martins (2018), cultivar *Khaya grandifoliola in vitro* por períodos entre 25 e 45 dias, permitiu melhores resultados, com seu clímax aos 25 dias.

De forma geral, recomenda-se o cultivo da espécie *in vitro* sem a utilização do BAP, durante um período de 25 dias, permitindo a produção de plantas mais vigorosas, com maiores taxas de multiplicação e baixa produção de calos.

#### 4.4. Multiplicação: Citocinina x Auxina (TDZ e ANA)

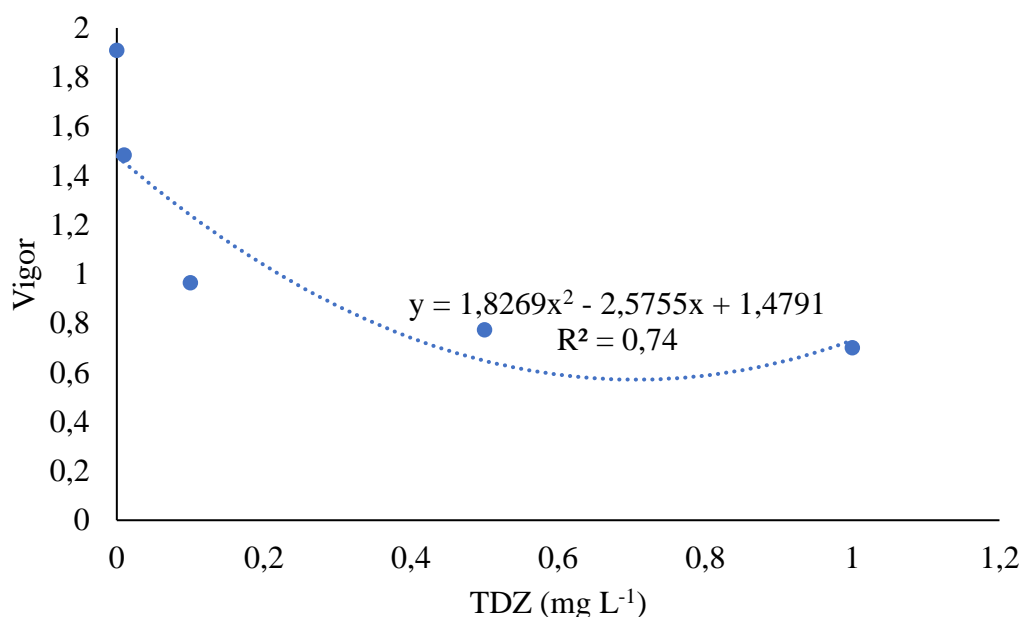
As concentrações de TDZ utilizadas influenciaram as variáveis vigor, número de brotações e tamanho de calos ( $p < 0,05$ ). O fator concentração de ANA influenciou as respostas de vigor, mas não foi observada interação significativa entre os fatores para nenhuma das variáveis ( $p \geq 0,05$ ). O número de gemas e tamanho das brotações não diferiram significativamente entre si para nenhuma condição (Tabela 7).

**Tabela 7.** Resultado da análise de variância para o vigor, número de gemas e tamanho de calos, a partir de segmentos nodais de *Khaya grandifoliola* inoculados *in vitro* em função da concentração de thidiazuron (TDZ) e ácido naftaleno acético (ANA), 45 dias após a inoculação.

Variável	P			CV (%)
	TDZ	ANA	TDZ x ANA	
Vigor	$9,0 \times 10^{-5*}$	0,0029*	0,7657 <sup>ns</sup>	73,15
Número de gemas	0,1796 <sup>ns</sup>	0,3276 <sup>ns</sup>	0,5481 <sup>ns</sup>	53,05
Número de brotações	0,0337*	0,2830 <sup>ns</sup>	0,4514 <sup>ns</sup>	28,85
Tamanho médio das brotações	0,7346 <sup>ns</sup>	0,6099 <sup>ns</sup>	0,6691 <sup>ns</sup>	30,63
Tamanho de calos	0,0159*	0,4137 <sup>ns</sup>	0,2091 <sup>ns</sup>	60,29

CV: Coeficiente de Variação; P: probabilidade do valor P; \*:  $p < 0,05$ ; ns:  $p \geq 0,05$ .

O vigor apresentou efeito polinomial quadrático para a presença do TDZ (Figura 10), apresentando maiores valores em sua ausência ou em baixas concentrações. Enquanto para ANA, teve melhores respostas em sua ausência (Tabela 8).



**Figura 10.** Modelo polinomial quadrático para vigor em função da concentração de TDZ em segmentos nodais de *Khaya grandifoliola*, aos 45 dias de cultivo, via curva de regressão ajustada.

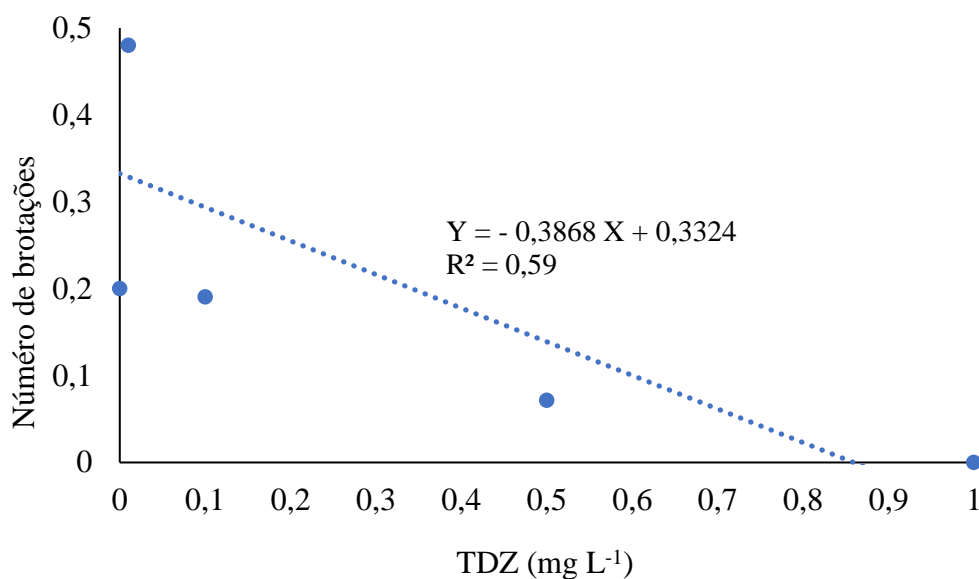
**Tabela 8.** Valores médios de vigor sob diferentes concentrações de ANA, a partir de *explantes* de *Khaya grandifoliola* inoculados *in vitro*.

ANA (mg L <sup>-1</sup> )	Vigor
0	1,36 a
0,1	0,85 b

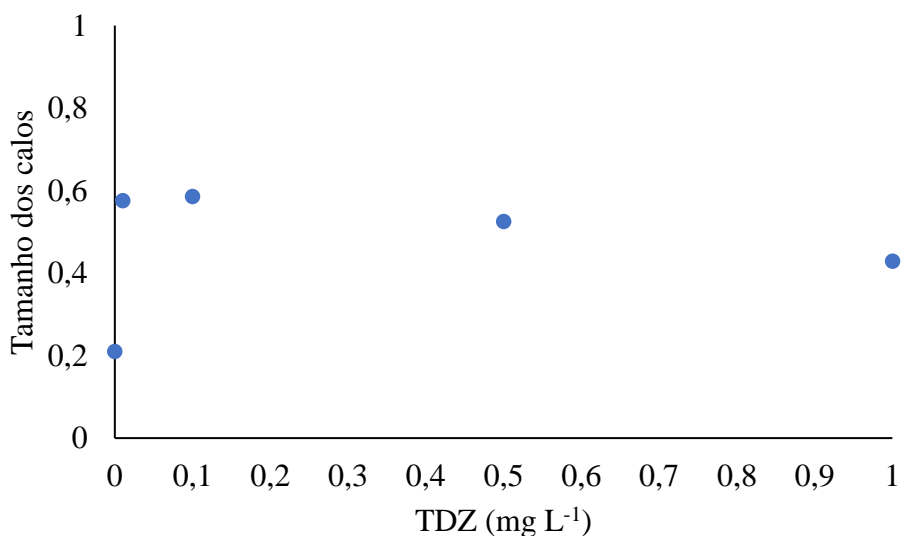
Médias seguidas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade.

Já o número de brotações apresentou efeito linear para a presença do TDZ (Figura 11), com uma tendência de redução com o aumento da concentração do hormônio.

A variável tamanho dos calos diferiu significativamente entre as concentrações de TDZ, no entanto nenhum modelo de regressão foi significativo no ajuste dos dados. Ao se observar a distribuição dos dados médios em função do aumento da concentração do TDZ, pode-se constatar que na ausência do hormônio foram observados menores valores do tamanho de calos (Figura 12).



**Figura 11.** Modelo polinomial linear para número de brotações em função da concentração de TDZ em segmentos nodais de *Khaya grandifoliola*, aos 45 dias de cultivo, via curva de regressão ajustada.



**Figura 12.** Médias do tamanho de calo em função da concentração de TDZ em segmentos nodais de *Khaya grandifoliola*, aos 45 dias de cultivo.

O TDZ é um importante herbicida que em baixas concentrações têm sido utilizado em muitos trabalhos de micropropagação como um regulador de crescimento, sendo classificado como citocinina artificial, que induz muitas respostas semelhantes às naturais, muito utilizado na multiplicação de espécies lenhosas e recalcitrantes à propagação, sendo mais eficaz em

baixas concentrações, de 10 a 1000 vezes inferiores a outros fitohormônios (Guo *et al.*, 2011; Kurup *et al.* 2018). Segundo Huetteman e Preece (1993) a variação das concentrações de TDZ pode ocasionar diferentes respostas morfológicas nas plantas, variando entre indução de brotações laterais, indução de calos, organogênese e morte dos explantes, apresentando melhores respostas em baixas concentrações.

Por sua vez, as respostas morfogênicas variam de acordo com sua dose, etapa de desenvolvimento e material vegetal. Ahmed (2022) ao avaliar o efeito do TDZ em explantes foliares de *Dimocarpus logan*, observou que a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> proporcionou melhores resultados. Por sua vez, para *Mangifera indica* L. seu uso em segmentos cotiledonares não proporcionou melhores respostas (Conde *et al.*, 2023). Já Ioannidis *et al.* (2023) ao estudarem a influência do TDZ em segmentos nodais de *Juniperus drupacea* Labill. observaram que a utilização de 0,88 mg L<sup>-1</sup> possibilitou uma maior taxa de brotação enquanto 0,22 mg L<sup>-1</sup> permitiu um maior alongamento das brotações. Diferentemente destes trabalhos, em *Khaya grandifoliola*, o uso deste componente não proporcionou grandes ganhos, nas concentrações entre 0,01 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, observado pelas perdas de vigor e nas taxas de multiplicação, todavia permitiu uma maior produção de calos, variável que pode ser explorada em estudos de calogênese.

O ANA compõe o grupo de auxinas sintéticas que apresentam considerável importância agrícola, sendo utilizado em diversas técnicas para enraizamento de plantas (Mercier, 2012). Sendo uma das auxinas sintéticas mais utilizadas para promover o enraizamento, capazes de atuar na divisão, diferenciação celular, iniciação e desenvolvimento radicular (Srivastava, 2002). Martins *et al.* (2013) ao avaliarem a influência do ANA e AIB no enraizamento de *Neoregelia concentrica*, obtiveram melhores respostas, com a utilização de ANA. Já Navroski, Reiniger e Pereira (2015), ao avaliarem a influência de diferentes concentrações de ANA em *Eucalyptus dunnii*, observaram que a adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> proporciona um aumento no número e tamanho de brotações, enquanto concentrações superiores ocasionam a formação de estruturas hiperhídricas. Contrariando estes estudos, o uso do ANA em *Khaya grandifoliola* não proporcionou melhores respostas para multiplicação, todavia influenciou negativamente o vigor das plantas.

Neste contexto, o balanço hormonal exerce um papel primordial no desenvolvimento e diferenciação das plantas, de forma que as concentrações relativas entre auxina e citocinina podem ser mais importantes do que suas concentrações absolutas (Sousa; Miranda, 2006). Atuando na regulação do desenvolvimento entre parte aérea e radicular das plantas, em que maiores concentrações de auxina tornam propício ao enraizamento, através da diferenciação radicular e o balanço inverso promove a formação de parte aérea, por meio da proliferação de brotos (Couto; Araujo; Aguilar, 2021; Sousa; Miranda, 2006). Em *Khaya grandifoliola* é evidente a escassez de estudos que abordem a interação de diferentes regulares de crescimento no desenvolvimento das plantas *in vitro*, sendo essencial a realização de novos estudos visando esclarecer demais aspectos para a propagação da espécie.

## 5. CONCLUSÃO

Para a desinfestação de sementes de *Khaya grandifoliola*, recomenda-se a retirada do tegumento e a imersão das sementes em hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 2,5% por 10 minutos, para estabelecimento *in vitro* da espécie.

Para a multiplicação *in vitro* da espécie, é recomendado o cultivo por um período de 25 dias em meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento. A utilização de BAP e TDZ nas concentrações testadas não são eficientes para emissão de novas brotações.

Desta forma recomenda-se a investigação de outros reguladores de crescimento disponíveis no mercado, com potencial de aprimorar a taxa de multiplicação, assim como a continuidade de estudos que abordem outras etapas da propagação *in vitro* da espécie.

## 6. REPEFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M. E. A. *In vitro* propagation for conservation and genetic fidelity of the near threatened *Dimocarpus longan* plant. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 130, 2022.

AKIN-IDOWU, P. E. *et al.* Plant tissue culture: Current status and opportunities. **Afr. J. Biotechnol**, v. 81, p. 637-823, 2009.



AKINYELU, J. *et al.* Evaluation of the Antioxidant, Antidiabetic, and Anticholinesterase Potential of Biogenic Silver Nanoparticles from *Khaya grandifoliola*. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 11, n. 1, p. 82-92, 2023.

ALVES JUNIOR, C. *et al.* Water uptake mechanism and germination of *Erythrina velutina* seeds treated with atmospheric plasma. **Sci. Rep.** v. 6, 33722, 2016.

ASSIS, T. F. de; REIS, C. A. F. Produção de mudas clonais de teca por miniestaqueia. *In*: REIS, C. A. F.; OLIVEIRA, E. B. de; SANTOS, A. M. **Teca (*Tectona grandis* L. f.) no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2023.

AZEVEDO, M. L. de *et al.* Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de miniestacas caulinar e foliar de mogno-africano (*Khaya grandifoliola* C. DC.). **Ciência Florestal**, v. 31, p. 898-919, 2021.

BOUKA DIPLET, U. G. *et al.* Des confusions entre espèces préjudicables à la gestion durable des essences forestières: L'exemple des acajous d'Afrique (*Khaya*, Meliaceae). **Bois Forêts Des Trop.** v. 339, p. 17–32, 2019.

CAMPELO, N. R.; COELHO, G. T. C. P. Mogno Africano (*Khaya grandifoliola*) no Brasil-uma revisão de literatura. **Revista Maestria**, v. 18, p. 59-66, 2023.

CONDE, F. *et al.* *In vitro* establishment and micropropagation of mango (*Mangifera indica* L.) from cotyledonary nodes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, p. 197-208, 2023.

COSTA, F. H. S. *et al.* Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 31-37, 2008.

COUTO, T. R.; ARAUJO, J. S.; AGUILAR, J. P. Balanço hormonal auxina/citocinica para multiplicação *in vitro* de genótipos de Gérbera. **Revista Agrária Acadêmica**, v. 4, n. 1, p. 119-143, 2021.

DIAS, J. M. M. *et al.* Propagação da mangueira. *In*: ROZANE, D. E. *et al.* **Manga – Produção Integrada, Industrialização e Comercialização**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p. 79-134, 2005.

DIAS, J. N.; FREIRE, C. Quebra de dormência tegumentar na germinação de sementes de imbuia (*Ocotea porosa* (Nees; Mart.) Barroso, Lauraceae). **InterfaceHS–Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2017.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, 221 p.

FERRAZ FILHO, A. C. B. *et al.* African Mahogany Plantation Highlights in Brazil. **Floresta e Ambiente**, v. 28, n. 3, p. 1–3, 2021.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: An R package for ANOVA and experimental designs. **Appl. Math.** v. 5, n. 19, p. 2952–2958, 2014.

GALERIANI, T. M.; COSMO, B. M. N. Noções de fisiologias vegetal: germinação, transpiração, fotossíntese e respiração celular. **Revista Agronomia Brasileira**. São Paulo. v. 4, 2020.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: TORRES, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPICNPH, v. I, p. 183-260, 1998.

GUEDES, M. C. *et al.* Alternativas de baixo custo para produção de mudas. *In*: WADT, L. H. de O.; MAROCCOLO, J. F.; GUEDES, M. C.; SILVA, K. E. da (ed.). **Castanha-da-amazônia: estudos sobre a espécie e sua cadeia de valor**. Brasília, DF: Embrapa, 2023.

GUO, B. *et al.* Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, p. 8984-9000, 2011.

GUY-ARMAND, G. N. *et al.* Antiplasmodial, antioxidant and cytotoxicity activity of ethanol and aqueous extracts of *Khaya grandifoliola* stem bark. **Journal of Tropical Medicine**, 8062453, 2023.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**. Upper Sanddle River: Prentice Hall, 8 ed., 2014. 880p.

HUETTEMAN C. A.; PREECE J. E. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, n. 2, p. 105-119, 1993.

IOANNIDIS, K. *et al.* Potential and Constraints on *In Vitro* Micropropagation of *Juniperus drupacea* Labill. **Forests**, v. 14, n. 1, p. 142, 2023.

KURUP, S. S. *et al.* Thidiazuron (TDZ) induced organogenesis and clonal fidelity studies in *Haloylon persicum* (Bunge ex Boiss & Buhse): an endangered desert tree species. **Physiological and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 3, p. 683-692, 2018.

LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C.; CAMPELO, M. F. Protocol for obtaining *Cedrela odorata* L. plants through tissue culture. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, e9491210771, 2020.

LOZANO, D. L. G.; GUERRERO, M. L. O.; LÓPEZ, N. M. Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 17, n. 2, p. 76-84, 2015.

MARCHI, Y. R. R.; FERNANDES, D. À. **Doses de hipoclorito e tempos de contato no estabelecimento *in vitro* de sementes de rosa do deserto (*Adenium obesum* Roem. & Schult. (Forssk.))**. Trabalho de conclusão de curso em Agronomia, Varzea Grande, MT, 2020.

MARTENINGHI, S. L. V. Desenvolvimento e aquisição do potencial de germinação das sementes de castanha-da-amazônia (*Bertholletia excelsa* Bonpl.; Lecythidaceae). In: **Anais do VI Congresso de Iniciação Científica do INPA-CONIC**, pg. 1-4, Brasil, 2017.

MARTINS, J. P. R. *et al.* Effect of synthetic auxins on *in vitro* and *ex vitro* bromeliad rooting. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p. 138-146, 2013.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S.A. p. 217-249, 2004.

MORLAND, C. *et al.* Supply and demand functions for global wood markets: specification and plausibility testing of econometric models within the global forest sector. **Forest Policy and Economics**, v. 92, p. 92-105, 2018.

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.

NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; PEREIRA, M. O. Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido 1-naftilacético (ANA). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 79-86, 2015.

NURAIN, I. O.; BEWAJI, C. O. Effects of aqueous bark extracts of *Khaya grandifoliola* and *Enantia chlorantha* on some biochemical parameters in Swiss Mice. **Iranian Journal of Toxicology**, v. 11, n. 5, p. 13-21, 2017.

OLIVEIRA JUNIOR, M. A. **Cultivo *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) e de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2021.

ONOHUEAN, H. *et al.* *Annona muricata* linn and *Khaya grandifoliola* C. DC. Reduce oxidative stress *in vitro* and ameliorate plasmodium berghei-induced parasitemia and cytokines in BALB/c mice. **Journal of evidence-based integrative medicine**, v. 26, 2021.

OPOKU, M. E. *et al.* Effects of Biochar Soil Amendment on the Rooting and Early Growth of African Mahogany Species: *Khaya Ivorensis* and *Khaya Grandifoliola*. **J Bot Res**, v. 5, n. 1, p. 149-160, 2022.

OPUNI-FRIMPONG, E. *et al.* Managing mahogany plantation in the tropics: field guide for farmers. **Kumasi/Ghana: Forest Institute of Ghana**, 2016. 95 p.

OPUNI-FRIMPONG, E. *Khaya grandifoliola* C.DC. In: Louppe, D., Oteng-Amoako, AA & Brink, M. (Editores). PROTA (Recursos Vegetais da África Tropical / Recursos vegetais de l'Afrique tropicale), Wageningen, Holanda, 2008. Disponível em: [https://uses.plantnet-project.org/en/Khaya\\_grandifoliola\\_\(PROTA\)](https://uses.plantnet-project.org/en/Khaya_grandifoliola_(PROTA)). Acessado em: 6 de set. de 2023.

OWONA, B. A. *et al.* *Khaya grandifoliola* active fraction as a source of therapeutic compounds for Alzheimer's disease treatment: In silico validation of identified compounds. **In Silico Pharmacology**, v. 10, n. 11, 2022.

PASQUAL, M. *et al.* Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: Scherwinski-Pereira JE (ed) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 61-161, 2012.

PEREIRA, C. D. *et al.* Germinação e propagação *in vitro* de mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla* King). **Nativa**, v. 9, n. 5, p. 595-599, 2021.

PINHEIRO, A. L.; COUTO, L.; PINHEIRO, D. T.; BRUNETTA, J. M. F. C. **Ecologia, silvicultura e tecnologia de utilização dos mognos-africanos (*Khaya* spp.)**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Agrossilvicultura, 2011. 102 p.

PINHEIRO, M. V. M.; CARVALHO, A. C. P. P. de; MARTINS, F. B. Modificações no meio de cultura, fotoperíodo e tempo de cultivo afetam o alongamento e enraizamento *in vitro* de bananeira cv. Pacovan. **Nativa**, v. 6, n. 1, p. 27-32, 2018.

PRACIAK, A. *et al.* **The CABI encyclopedia of forest trees**. Oxfordshire: CABI, 2013. 523 p.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023.

RAI, A. C. *et al.* (Ed.). **Advances in Plant Tissue Culture: Current Developments and Future Trends**. Academic Press, 2022.

REIS, C. A. F.; OLIVEIRA, E. B. de; SANTOS, A. M. Mogno-africano (*Khaya* spp.): atualidades e perspectivas do cultivo no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 378 p.

RIBEIRO, A.; FERRAZ FILHO, A. C.; SCOLFORO, J. R. S. O cultivo do mognoafricano (*Khaya* spp.) e o crescimento da atividade no Brasil. **Floresta e Ambiente**, n. 24, p. 1-11, 2017.

RIBEIRO, A.; SILVA, C. S. J.; FERRAZ FILHO, A. C.; SCOLFORO, J. R. S. Financial and risk analysis of African mahogany plantations in Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 2, p. 148-158, 2018.

SALVADOR, T. L. **Morfometria, desenvolvimento pós-seminal e morfoanatomia de estruturas reprodutivas de cambuí [*Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.)**. Tese de Doutorado em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2020.

SANTOS, M. Á. S. dos *et al.* Aplicações da cultura de tecidos vegetais em plantas medicinais da Amazônia: uma revisão. **Ciências ambientais na Amazônia**, p. 77. 2021.

SANTOS, M. C. *et al.* Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 735-741, 2011.

SILVA, L. F. C.; CARVALHO, S. A. Germinação da semente de porta-enxertos de citros em função da presença do tegumento e sua orientação no substrato. **Citrus Research & Technology**, v. 28, n. 1-2, p. 47-59, 2007.

SOUSA, C. M.; MIRANDA, R. M. Otimização do balanço entre auxina e citocinina para multiplicação *in vitro* de gerbera jamesonii var. 'ornela'. **Revista Agronomia**, v. 40, n. 1-2, p. 66-72, 2006.

SOUSA, F.; BARREIRA, S. Mogno Africano (*Khaya* spp.): Um estudo Bibliométrico. **Enciclopedia Biosfera**, v. 19, n. 40, 2022. SRIVASTAVA, L. M. Auxins. In: Srivastava, L. M. **Plant growth and development**. San Diego: Academic Press; p. 155-169. 2022.

TAIZ L, ZEIGER E. **Plant Physiology**. 5th Edition. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TAIZ, L, ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2009. 848p.

TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. **Tissue culture of Corymbia and Eucalyptus**. *Forests*, v. 9, n. 2, p. 84, 2018.

WENDLING, I., DUTRA, L. F., GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2006. 55p.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: Princípios e técnicas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 2013.

YASODHA, R.; SUMATHI, R.; GURUMURTHI, K. Micropropagation for quality propagule production in plantation forestry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 159–170, 2004.