



Estabelecimento *in vitro* do mogno africano (*Khaya grandifoliola*) a partir de sementes e explantes

Maria Luiza de Azevedo¹
Miranda Titon²
Luiz Filipe Maravilha³
Huezer Viganô Sperandio⁴
Anthoinny Vitória dos Santos Silva⁵
Eric Bastos Gorgens⁶

¹UFVJM (marialuiza.azevedo@ufvjm.edu.br), ²UFVJM (mtiton@ufvjm.edu.br),
³UFVJM (filipe.maravilha@ufvjm.edu.br), ⁴UFVJM (huezer.sperandio@ufvjm.edu.br),
⁵UFVJM (anthoinny.silva@ufvjm.edu.br), ⁶UFVJM (eric.gorgens@ufvjm.edu.br)

RESUMO: *O estabelecimento in vitro é o primeiro passo da micropropagação e é considerada uma etapa crítica devido às altas taxas de contaminação. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de desinfestação de sementes e explantes de mogno africano para a micropropagação. As sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2,5% (v/v), pelos períodos de 10, 20, 30 e 40 minutos. Já para os explantes foram testadas concentrações de hipoclorito de sódio (1,25 e 2,5%) e antioxidantes (carvão ativado e PVP). O tratamento mais eficiente para a assepsia das sementes foi a desinfestação em hipoclorito de sódio por 20 minutos. Já para os explantes, os melhores resultados foram encontrados com a utilização de hipoclorito de sódio 2,5% acrescido de carvão ativado.*

Palavras-chave: micropropagação, contaminação, oxidação

Introdução

A micropropagação é uma técnica utilizada para várias espécies, produzindo mudas homogêneas em condições estéreis (Guerra et al., 2022). O estabelecimento é o primeiro passo da micropropagação e é considerada uma etapa crítica em função das altas taxas de contaminação (Gammoudi et al., 2022). Embora pareça uma etapa simples, a descontaminação em algumas espécies é extremamente difícil (Gammoudi et al., 2022).

Vários produtos podem ser utilizados para a desinfestação, como o etanol 70% e o hipoclorito de sódio, em concentrações variadas (Dutra et al., 2009). À vista disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver protocolos de desinfestação de sementes e explantes para o estabelecimento *in vitro* do mogno africano (*Khaya grandifoliola* C. DC.).

Material e métodos

*Desinfestação das sementes de *Khaya grandifoliola* para o estabelecimento in vitro*

O experimento foi realizado no laboratório de cultura de tecidos, da Universidade Federal dos



Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio, na concentração de 2,5%, por 20 minutos, e então se realizou três enxagues com água deionizada e autoclavada. Os tegumentos foram retirados, e as sementes imersas em solução de fungicida Cuprocarb 500® (1g L⁻¹), durante 15 minutos. Novamente fez-se a tríplice lavagem das sementes. Foram então imersas em álcool 70% por um minuto, e depois em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2,5%, com 4 gotas de detergente Twenn 20 a cada 100 ml de solução, pelos períodos de 10, 20, 30 e 40 minutos. E finalmente enxaguadas seis vezes.

Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em tubos de ensaio, contendo meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com 50% dos sais e vitaminas, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 20 g L⁻¹ de sacarose, 3 g L⁻¹ de carvão ativado, e 6,5 g L⁻¹ de ágar Dinâmica®. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm. Após introduzir as sementes, os tubos de ensaio foram transferidos para a sala de cultura sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, constituído por 4 tratamentos (10, 20, 30 e 40 minutos no hipoclorito de sódio). Aos 56 dias, foram avaliadas as porcentagens de germinação, contaminação e emergência. Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando houve diferença significativa, utilizou-se regressão linear ao nível de 5% de significância.

*Desinfestação dos explantes de *Khaya grandifoliola* para o estabelecimento *in vitro**

Os explantes utilizados foram obtidos de mudas, com cerca de um ano de idade. As mudas foram acondicionadas em bandejas contendo água, evitando o contato da parte aérea com a água de irrigação, visando diminuir a contaminação *in vitro*. Os explantes, foram coletados, com tamanhos entre 1 e 2 cm, e levados para o laboratório de cultura de tecidos, da UFVJM. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em fungicida Cuprocarb 500® (1g L⁻¹), durante 15 minutos, seguido do triplo enxague com água deionizada e autoclavada. Posteriormente foram colocados em álcool 70% por 30 segundos, e logo após, em hipoclorito de sódio nas concentrações de 1,25 ou 2,5%, com 4 gotas de Tween 20 a cada 100 ml de solução, por 15 minutos, e posteriormente enxaguados seis vezes.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) com 50% da concentração de sais, suplementado com reguladores de crescimento BAP 1 mg L⁻¹ e ANA 0,5 mg L⁻¹; 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol; e 6,5 g L⁻¹ de ágar Dinâmica®; e conforme os tratamentos adicionou-se carvão ativado 3 g L⁻¹ ou PVP 0,8 g L⁻¹. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1, e em seguida autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121°C. Depois de introduzir o material vegetal, os tubos de ensaio foram mantidos no escuro durante 7 dias para redução dos índices de oxidação



fenólica. Em seguida, foram transferidos para sala de cultura de tecidos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos (Tabela 01). Aos 30 dias após a introdução, foram avaliadas as porcentagens de contaminação e oxidação. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativa, utilizou-se o teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 1- Tratamentos utilizados no estabelecimento de ápices caulinares de mogno africano (*Khaya grandifoliola*).

Tratamentos	Concentração de Hipoclorito de sódio (%)	Carvão ativado gL ⁻¹	PVP gL ⁻¹
2,5% hipoclorito + carvão	2,5	3	0
2,5% hipoclorito + pvp	2,5	0	0,8
1,25% hipoclorito + carvão	1,25	3	0
1,25% hipoclorito + pvp	1,25	0	0,8

Resultados e discussão

Desinfestação das sementes de Khaya grandifoliola para o estabelecimento in vitro

Com o aumento do tempo de imersão em hipoclorito de sódio houve redução linear da contaminação (Figura 1A). O tratamento 10 minutos de imersão em hipoclorito de sódio obteve uma média de 37% de sementes contaminadas. Com o aumento no tempo de imersão para 20, 30 e 40 minutos atingiu-se uma redução na contaminação de 13, 16 e 7% respectivamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a porcentagem de germinação, aos 56 dias (Figura 1B). Apesar da elevada taxa de germinação, obteve-se baixa taxa de emergência destas sementes germinadas (Figura 1C). Nos tratamentos 10, 20, 30 e 40 minutos de imersão no hipoclorito de sódio obteve-se respectivamente 40, 44, 36 e 22% de sementes com desenvolvimento da parte aérea.

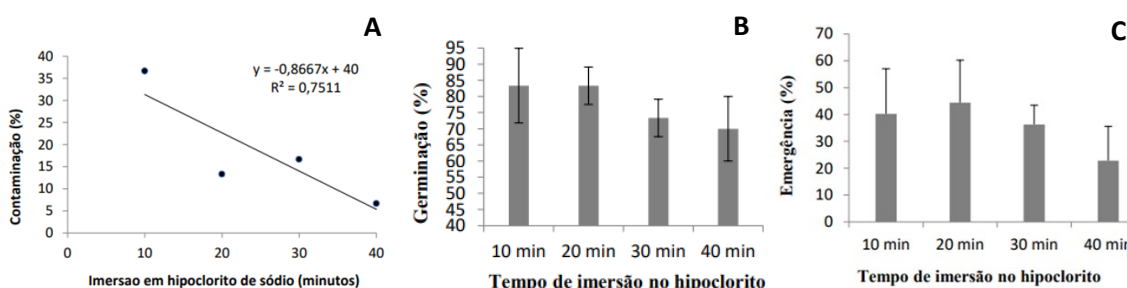


Figura 1- Porcentagem de contaminação e germinação de sementes de *Khaya grandifoliola*, aos 56 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%. As barras indicam o desvio padrão.

O hipoclorito de sódio fica retido na superfície da semente e, mesmo após a lavagem, o resíduo pode provocar reações com compostos orgânicos. Quanto maior o tempo exposto ao produto, mais resíduo é adsorvido pela semente, reagindo com os aminoácidos, gerando cloreto de amônio e dióxido



de carbono no tubo de ensaio (Santos et al., 2020). Além disso, a hidrólise do hipoclorito de sódio produz ácido hipocloroso (HClO), um composto tóxico que leva a alterações celulares e fotossintéticas, afetando o crescimento das mudas, o que causa formação anormal de mudas (Gamage et al., 2018).

O hipoclorito de sódio é um forte agente com efeito antimicrobiano de amplo espectro, sendo acessível em termos de custo e benefício (Kohler et al., 2018). Os fatores como concentração do agente esterilizante e tempo de exposição ao mesmo contribuem para o sucesso da desinfestação. Esses resultados indicam a eficiência do hipoclorito de sódio no controle de contaminações *in vitro* das sementes *Khaya grandifoliola*.

Desinfestação dos explantes de Khaya grandifoliola para o estabelecimento in vitro

O tratamento que apresentou maior eficiência para o controle da contaminação foi o hipoclorito de sódio 2,5% acrescido de carvão ativado, apresentando 36% de explantes contaminados (Figura 2A). Os diferentes tratamentos afetaram significativamente a oxidação dos explantes, sendo que os tratamentos com hipoclorito de sódio 2,5% acrescido de PVP e hipoclorito de sódio 1,25% acrescido de PVP, apresentaram respectivamente médias de 13,9 e 8,3% de oxidação. Nos demais tratamentos não ocorreram oxidação, demonstrando maior eficiência do carvão ativado (Figura 2B).

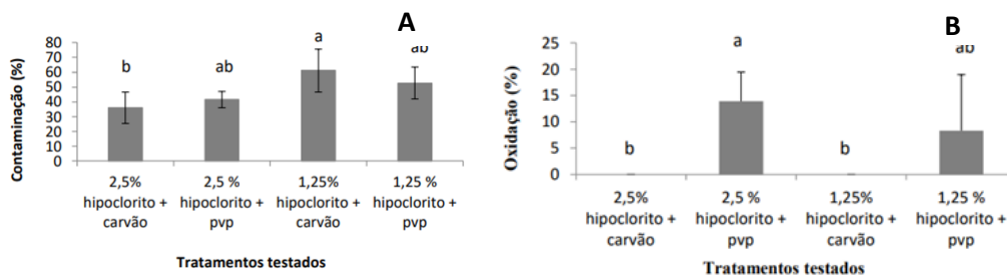


Figura 2- Porcentagem de contaminação e oxidação de ápices caulinares de *Khaya grandifoliola* em função dos tratamentos testados aos 30 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras indicam o desvio padrão.

A contaminação influencia a fase inicial do cultivo *in vitro*, sendo um problema para a produção em larga escala de espécies de interesse econômico (Singh et al., 2013). Baixas concentrações do agente desinfestante associadas a curtos tempos de imersão beneficiam a sobrevivência dos explantes. Porém, essa condição nem sempre promove uma desinfestação satisfatória. Neste trabalho a maior concentração testada de hipoclorito de sódio foi mais eficiente no controle da contaminação e não afetou a sobrevivência dos explantes.



A oxidação ocorre devido ao corte realizado no explante, promovendo a liberação de compostos fenólicos, modificando o meio de cultura e interferindo na absorção de nutrientes, podendo ocasionar a morte dos tecidos (Mudoí et al., 2014). Neste trabalho, os tratamentos em que foi adicionado carvão ativado não tiveram oxidação. O carvão ativado possui cargas residuais, que são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, evitando o processo de oxidação *in vitro* (Thomas, 2008).

Conclusão

O tratamento que apresentou os melhores resultados em relação ao conjunto de variáveis analisadas para a assepsia de sementes foi a desinfestação em hipoclorito de sódio 2,5% por 20 minutos. Já para o estabelecimento *in vitro* dos explantes foi à utilização de hipoclorito de sódio 2,5% acrescido de carvão ativo.

Referências bibliográficas

- DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação do eucalipto. Pesquisa Florestal Brasileira. n.58, p.49-59, 2009.
- GAMAGE, D.; THOMPSON, M.; SUTHERLAND, M.; HIROTSU, N.; MAKINO, A.; SENEWEERA, S. New sights into the cellular mechanisms of plant growth at elevated atmospheric carbon dioxide concentrations. Plant, Cell & Environment. v. 41, p. 1233-1246, 2018.
- GAMMOUDI, N.; NAGAZ, K.; FERCHICHI, A. Establishment of optimized *in vitro* disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi– objective genetic algorithm. BMC Plant Biology. v. 22, p. 1-13, 2022.
- GUERRA, F., PEÑALOZA, P., VIDAL, A., CAUTÍN, R., CASTRO, M. Seed Maturity and Its *In Vitro* Initiation of Chilean Endemic Geophyte *Alstroemeria pelegrina* L. Horticulturae. v. 8, p. 464, 2022.
- KÖHLER, A.T., RODLOFF, A.C., LABAHN, M., REINHARDT, M., TRUYEN, U., SPECK, S. Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Journal of hospital infection. v. 100, p. e40-e46, 2018.
- MUDOÍ, K.D.; SAÍKIA, S.P.; BORTHAKUR, M. Efeito de posições nodais, variações sazonais, touceiras e reguladores de crescimento na micropropagação de bambu comercialmente importante, *Bambusa nutans* Wall. ex. Munro. Jornal Africano de Biotecnologia. v. 13, p. 1961-1972, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. v.15, p.473-497, 1962.
- SANTOS, M.M.D., CEZARIO, L.F.C., SIMÕES, I.M., BAPTISTA, J.O., ARAUJO, C.P.D., MELLO, T. D., ... & Alexandre, R. S. Disinfection protocol and *in vitro* germination of seeds of *Dalbergia nigra*. Cerne. v. 26, 238-246, 2020.
- SINGH, S.R.; SINGH, R.; KALIA, S.; DALAL, S.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R.K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo - a plant with extraordinary qualities. Physiology and Molecular Biology of Plants. v. 19, p. 21-41, 2013.
- THOMAS, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, v. 26, p. 618-631, 2008.

