

**BAP e tempo de cultivo na multiplicação *in vitro* de *Khaya grandifoliola****Benzylaminopurine and cultivation time in the *in vitro* multiplication of *Khaya grandifoliola**João Victor Baptista Silveira<sup>1</sup>, Natane Amaral Miranda<sup>2</sup>**RESUMO**

*Khaya grandifoliola*, conhecida popularmente como mogno africano, destaca-se como uma importante espécie florestal, amplamente utilizada no setor movelaria e construção civil. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de BAP e tempo de cultivo na multiplicação *in vitro* de *Khaya grandifoliola*, utilizando segmentos nodais. 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, sendo as plantas avaliadas dos 25 aos 60 dias de cultivo, em intervalos de 5 dias. Observou-se influência do regulador de crescimento e do tempo de cultivo no desenvolvimento *in vitro* das plantas. A adição do BAP ao meio nutritivo proporcionou um aumento do número de gemas, bem como produção de calos, mas não foi suficiente para a geração de brotações, demonstrando seu potencial de uso em outros métodos de multiplicação celular da espécie. Aos 25 dias de cultivo *in vitro* de *Khaya grandifoliola* foi observado o melhor vigor dos tecidos, indicando uma rápida resposta ao estímulo hormonal. Para a multiplicação *in vitro* da espécie recomenda-se a investigação de outros reguladores de crescimento disponíveis no mercado, além da continuidade de estudos na área.

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

**ABSTRACT**

*Khaya grandifoliola*, popularly known as African mahogany, stands out as an important forest species, widely used in the furniture and construction sectors. The present work aimed to evaluate the influence of BAP and cultivation time on the *in vitro* multiplication of *Khaya grandifoliola*, using nodal segments. Concentrations of 0, 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP added to the nutrient medium, with the plants being evaluated from 25 to 60 days of cultivation, at intervals of 5 days. The influence of the growth regulator and cultivation time on the *in vitro* development of plants was observed. The addition of BAP to the nutrient medium provided an increase in the number of buds, as well as callus production, but was not sufficient for the generation of shoots, demonstrating its potential for use in other cell multiplication methods of the species. After 25 days of *in vitro* cultivation of *Khaya grandifoliola*, better tissue vigor was observed, indicating a rapid response to hormonal stimulation. For *in vitro* multiplication of the species, it is recommended to investigate other growth regulators available on the market, in addition to continuing studies in the area.

**Keywords:** African mahogany. BAP. Micropropagation. Growth regulators.

<sup>1</sup> Mestrando em Genética e Melhoramento em Universidade Federal de Viçosa.

<https://orcid.org/0009-0002-7331-4812>

E-mail: joao.bapt@outlook.com

<sup>2</sup> Doutora em Ciência Florestal e Professora adjunta em Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

<https://orcid.org/0000-0001-8197-5421>

## 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 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.

*Khaya grandifoliola* apresenta grande uso e importância no gênero, 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, 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, a produção uniforme de mudas de alta qualidade torna-se essencial para o atendimento deste mercado.

A Micropropagação é um importante método 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). Em 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).

Conhecimento sobre os fatores 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 objetivo avaliar a influência do tempo de cultivo e diferentes

concentrações de benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Khaya grandifoliola*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

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.

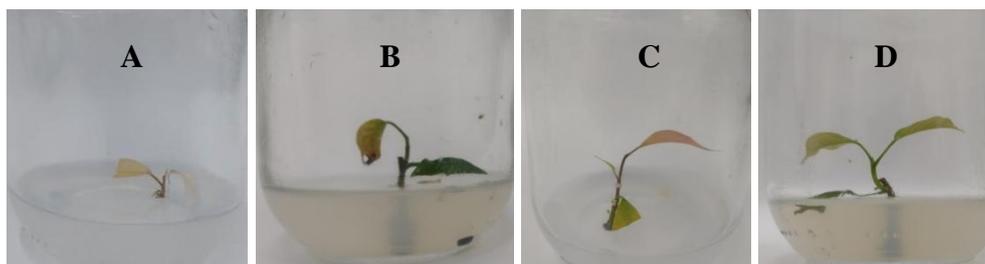
### 2.1. TEMPO DE CULTIVO X BAP

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 (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 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 subdivida, organizados em 8 parcelas (Tempo), 5 subparcelas (Concentrações de BAP), 4 repetições com 4 frascos por repetição, sendo um explante por frasco de cultivo. As plantas foram mantidas em sala de cultura com temperatura (25±2°C) e fotoperíodo (16h) controlados.

### 2.2. COLETA E ANÁLISE DA DADOS

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 1).



**Figura 1.** 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. Realizou-se análise regressão polinomial utilizando o software R versão 4.2.3 (R CORE TEAM, 2023) e o pacote ExpDes (FERREIRA *et al.*, 2014). Além disso, para o ajuste e obtenção de superfície de resposta nas interações entre os fatores, utilizou-se o pacote rsm (LENTH, 2009), sendo considerado para o ajuste o modelo completo,  $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1*A + \beta_2*B + \beta_3*A^2 + \beta_4*B^2 + \beta_5*AB$ .

### 3. RESULTADOS

O vigor das plantas *in vitro* foi influenciado pela interação entre tempo de cultivo e a concentração de BAP ( $p < 0,05$ ). Já para as variáveis número de gemas e tamanho de calos, apenas o fator concentração de BAP influenciou significativamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultado da análise de variância para vigor, número de gemas e tamanho de calos, a partir de segmentos nodais de *Khaya grandifoliola* inoculados *in vitro*, em função do tempo de cultivo e concentração de bezilaminopurina (BAP).

	P-valor		
	Vigor	Gemas	Calo
<b>Tempo</b>	$1,8 \times 10^{-5*}$	$0,5086^{ns}$	$0,3723^{ns}$
<b>BAP</b>	$2,0 \times 10^{-16*}$	$0,01101^*$	$2,0 \times 10^{-16*}$
<b>Tempo x BAP</b>	$7,0 \times 10^{-6*}$	$0,5329^{ns}$	$0,4698^{ns}$
<b>CV<sub>parc.</sub> (%)</b>	74,49	31,74	26,39
<b>CV<sub>subparc.</sub> (%)</b>	22,06	19,85	14,04

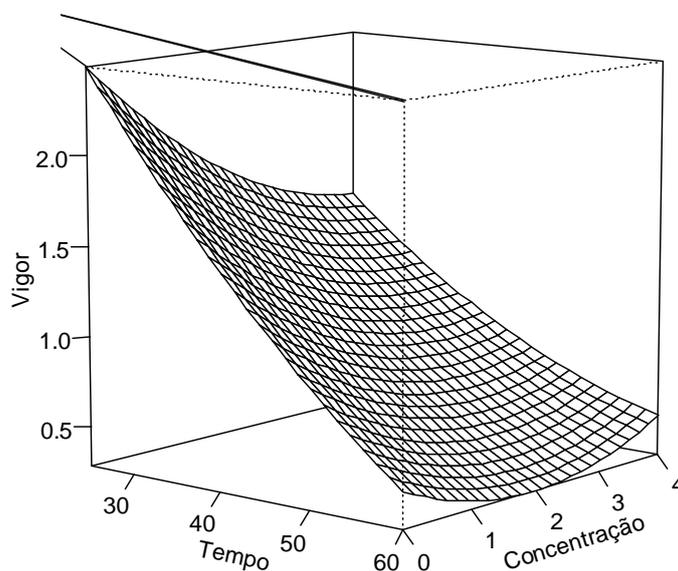
Legenda: CV: Coeficiente de Variação; P: Probabilidade do valor P; \*:  $p < 0,05$ ; ns:  $p \geq 0,05$ .

Para a variável vigor, os fatores tempo de cultivo e concentração de BAP influenciaram significativamente bem como sua interação, possibilitando a seguinte superfície de resposta ajustada (Figura 2):

$$\gamma = 4,6124 - 0,0968T - 0,6250C + 0,0005T^2 + 0,0527C^2 + 0,0070TC$$
$$(R^2 = 0,64)$$

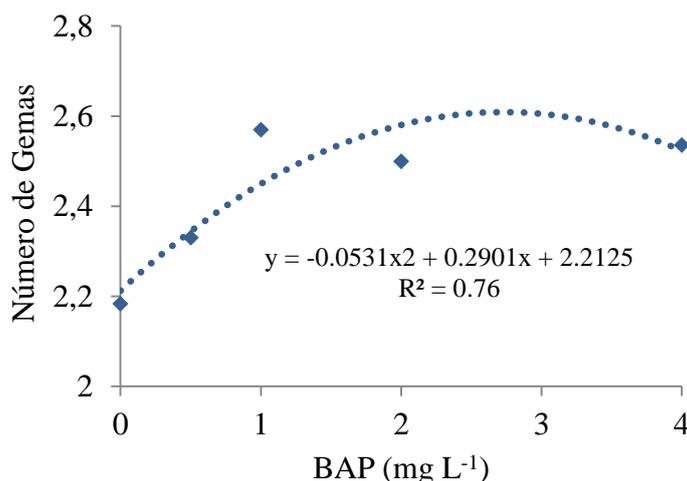
Dado:  $T = \text{Tempo de cultivo}$ ;  $C = \text{Concentração de BAP}$

Desta forma, pode-se observar que o aumento do tempo de cultivo e da concentração do hormônio, permitem um decréscimo do vigor, apresentando maiores valores em ausência do hormônio ou baixas concentrações e menores tempos (25 dias de cultivo). Além disso, pode-se obter pontos críticos de mínimo, visto que os Betas ( $\beta$ ) associados aos termos quadráticos são positivos. O tempo de cultivo crítico (mínimo) pode-se estimar:  $T_c = 96,8 - 7C$ , enquanto para a concentração crítica (mínima), tem-se:  $C_c = 5,93 - 0,0664T$ .



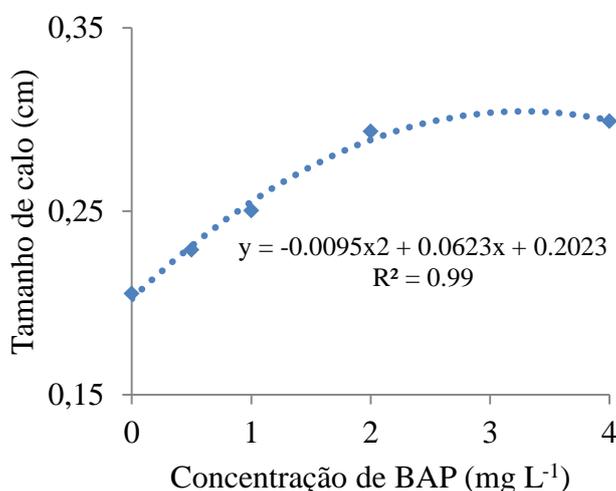
**Figura 2.** Superfície de resposta quadrática ajustada para vigor, a partir de segmentos nodais de *Khaya grandifoliola* inoculados *in vitro*, em função do tempo de cultivo e da concentração de bezilaminopurina (BAP).

O número de gemas produzidas pelos segmentos nodais *in vitro* foi influenciado pela concentração de BAP, observando-se um crescimento com o aumento da concentração do regulador, até atingir um ponto crítico de máximo aos 2,71 mg L<sup>-1</sup> de BAP, permitindo uma produção 2,61 gemas por explante (Figura 3).



**Figura 3.** Modelo polinomial quadrático ajustado para número de gemas, a partir de segmentos nodais de *Khaya grandifoliola* inoculados *in vitro*, em função da concentração de bezilaminopurina (BAP).

Quanto ao tamanho dos calos, pode-se também observar uma tendência de crescimento em função da adição do hormônio (Figura 4), até atingir um ponto máximo na concentração de 3,28 mg L<sup>-1</sup> de BAP, com uma produção de calos de aproximadamente 0,30 cm.



**Figura 4.** Modelo polinomial quadrático ajustado para tamanho de calos, a partir de segmentos nodais de *Khaya grandifoliola* inoculados *in vitro*, em função da concentração de bezilaminopurina (BAP).

#### 4. DISCUSSÃO

Os hormônios são biomoléculas ou mensageiros químicos produzidos pelas células que modulam os processos celulares em outras células, permitindo induzir diferentes respostas fisiológicas, ou seja, podem ser caracterizados como os principais agentes indutores de estímulos fisiológicos, sendo os reguladores de crescimento sua forma sintética e alternativa aos mesmos (CID, 2010). Estes reguladores podem ser adicionados à 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. Para *Cedrella odorata* L., a utilização de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP permitiu uma melhor indução de brotações, possibilitando sucesso na etapa de multiplicação durante o cultivo *in vitro* (LAMEIRA; CORDEIRO; CAMPELO, 2020).

Em *Khaya grandifoliola*, a utilização do hormônio BAP na concentração de 2,71 mg L<sup>-1</sup> permitiu um maior número de gemas. Entretanto é importante que a fase de multiplicação seja melhor investigada, avaliando outros fatores que podem influenciar a proliferação da espécie *in vitro*. Além disso, a utilização de 3,28 mg L<sup>-1</sup> de BAP permitiu a maximização de tamanho dos calos. Apesar de não haver a emissão de novas brotações axilares para os tratamentos avaliados, a proliferação de gemas e calos são um importante indicativo do potencial de aplicação do componente em outros métodos de multiplicação celular.

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 a permanência por um período muito reduzido pode representar baixo desenvolvimento das plantas, 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 influência do sorbitol e sacarose pelo tempo na conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa*, 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. Cultivar *Khaya grandifoliola in vitro* por períodos entre 25 e 35 dias, permitiu melhores resultados, com seu clímax aos 25 dias, permitindo a produção de plantas mais vigorosas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a multiplicação *in vitro* de *Khaya grandifoliola* é indicado o cultivo por um período de 25 dias com adição de 2,71 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Para cultivo de calos, as maiores concentrações de BAP são mais promissoras. Todavia, a utilização de BAP 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.

## REFERÊNCIAS

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.

CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010.

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.

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.

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.

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

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.

LENTH R. V. Response-Surface Methods in R, Using rsm. **Journal of Statistical Software**, v. 32, n. 7, 2009. p. 1–17.

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.

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.

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.plantnetproject.org/en/Khaya\\_grandifoliola\\_\(PROTA\)](https://uses.plantnetproject.org/en/Khaya_grandifoliola_(PROTA)). Acessado em: 6 de set. de 2023.

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.

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.

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.

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.

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.