

**INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA  
LUIZA COSTA FREITAS**

**AVALIAÇÃO DA ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA E GERMINAÇÃO IN VITRO  
DE SEMENTES DE *Khaya senegalensis* A. JUSS. (MOGNO-AFRICANO)**

**SÃO JOÃO EVANGELISTA  
2019**

**LUISA COSTA FREITAS**

**AVALIAÇÃO DA ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA E GERMINAÇÃO IN VITRO  
DE SEMENTES DE *Khaya senegalensis* A. JUSS. (MOGNO-AFRICANO)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Minas Gerais - Campus São João Evangelista como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal.

Orientador(a): Profa. Dra. Caroline Junqueira Sartori

**SÃO JOÃO EVANGELISTA**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

F849a Freitas, Luisa Costa.  
2020

Avaliação da esterilização química e germinação *in vitro* de sementes de *Khaya senegalensis* A. JUSS. (MOGNO-AFRICANO). / Luisa Costa Freitas. – 2020.  
25fl; il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Florestal) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, 2020.

Orientadora: Dra. Caroline Junqueira Sartori.

1. Mogno-Africano. 2. Esterilização. 3. Micropropagação. I. Freitas, Luisa Costa. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista. III. Título.

CDD 631.53

Elaborada pela Biblioteca Professor Pedro Valério  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais.  
Campus São João Evangelista.  
Bibliotecária Responsável: Rejane Valéria Santos – CRB-6/2907

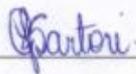
**LUISA COSTA FREITAS**

**AVALIAÇÃO DA ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA E GERMINAÇÃO IN VITRO  
DE SEMENTES DE *Khaya senegalensis* A. JUSS. (MOGNO-AFRICANO)**

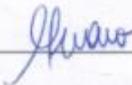
Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao Instituto Federal de Minas Gerais -  
Campus São João Evangelista como  
exigência parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia Florestal.

Aprovada em: 12 / 12 / 2019

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Profa. Dra. Caroline Junqueira Sartori  
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista



Profa. Me. Ana Carolina Ferraro  
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista



Me. Ari Medeiros Braga Neto  
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São João Evangelista

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
irmãs, família, amigos e a todos que se  
fizeram presentes, acreditaram e  
confiaram em mim.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me capacitou para que esse sonho se tornasse realidade.

Aos meus pais, Sandro e Edilene e irmãs, pelo amor, apoio e por nunca desistirem de mim. Agradeço por todas as palavras ditas que me motivaram a seguir em frente.

À minha família e amigos que demonstraram apoio e carinho, em especial Isabella e Patrícia que se fizeram presentes mesmo distantes.

Aos amigos Igor, Stéfane, Gleiciane e Guilherme por tornarem esses anos mais alegres e gratificantes, muito obrigada pela parceria e amizade.

Agradeço à Antoniele, Carla, Júlia, Carol, Karine, Gabriel e Pablo, por tornarem o final da graduação a melhor parte dela. Que nosso encontro seja em breve, todo sucesso do mundo pra vocês.

À minha parceira de pesquisa Isabela, agradeço por toda ajuda na execução e desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço à Caroline Sartori, por se tornar mais que uma orientadora e me apoiar em cada decisão. Seus conselhos, carinho e amizade serão pra sempre lembrados.

Aos meus professores que são exemplos de profissionais, que além de ensinar, aconselham e nos inspiram a buscar sermos melhores a cada dia.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, por possibilitar a execução deste trabalho e pelas oportunidades ofertadas.

Muito obrigada!

## RESUMO

A espécie *Khaya senegalensis* é conhecida como Mogno-Africano, pertencente à família das Meliaceae e um dos problemas na sua produção é a difícil execução de coletas de sementes devido ao porte da árvore e a perda da viabilidade em um curto espaço de tempo. A micropropagação *in vitro* aparece como ferramenta importante para suprir tais dificuldades encontradas. Porém, esta técnica apresenta custo elevado e, além disso, a autoclavagem pode levar à decomposição de componentes do meio de cultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da utilização de hipoclorito de sódio na esterilização dos utensílios e preparo do meio de cultura na multiplicação *in vitro* de *Khaya senegalensis* (Mogno-Africano) em substituição à autoclavagem. O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG), campus São João Evangelista, onde as sementes passaram pelo processo de desinfecção e posteriormente foram inoculadas em meios de cultura MS, no qual se avaliou as seguintes dosagens de NaClO tendo como fonte água sanitária comercial: 2,0 mL.L<sup>-1</sup>; 5,0 mL.L<sup>-1</sup>; 10,0 mL.L<sup>-1</sup> e 20,0 mL.L<sup>-1</sup>. Na instalação do experimento o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em fatorial 5x2, sendo 5 níveis da variável concentrações de hipoclorito de sódio e 2 níveis da água utilizada no processo (destilada autoclavada e destilada sem autoclavar). Os ensaios tiveram os dados submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade. Os tratamentos em que se utilizou as doses de 5,0; 10,0 e 20,0 mL foram mais eficientes na esterilização dos meios. Estes resultados sugerem a viabilidade da utilização de hipoclorito de sódio para a esterilização de meios nutritivos para cultivo *in vitro* de Mogno-Africano, dispensando o emprego da autoclavagem como técnica de esterilização de meios de cultura.

Palavras-chave: Mogno-Africano. Esterilização. Micropropagação.

## ABSTRACT

The species *Khaya senegalensis* is known as African Mahogany, belonging to the Meliaceae family and one of the problems in its production is the difficult execution of seed collections due to the size of the tree and the loss of viability in a short time. In vitro micropropagation appears as an important tool to overcome such difficulties encountered. However, this technique is costly and, in addition, autoclaving can lead to decomposition of culture mediums components. The objective was this work is to evaluate the feasibility of using sodium hypochlorite in the sterilization of utensils and culture medium preparation in multiplication of *Khaya senegalensis* (African Mahogany) to replace autoclaving. The study was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory of the Federal Institute of Minas Gerais (IFMG) campus São João Evangelista, where the seeds went through the disinfection process and were later inoculated in MS culture mediums, where the following dosages were evaluated in NaClO, were evaluated based on commercial sanitary water: 2,0 ml.L<sup>-1</sup>; 5,0 ml.L<sup>-1</sup>; 10,0 ml.L<sup>-1</sup> e 20,0 ml.L<sup>-1</sup>. The experimental design used was a entirely randomized in a 5x2 factorial design, with 5 levels of sodium hypochlorite concentration and 2 levels of water used in the process (autoclaved distilled and non-autoclaved distilled). The assays had the data submitted to the analysis of variance, the means being compared by the Tukey test at 95% probability. The treatments in which doses of 5,0; 10,0 and 20,0 mL were used were more efficient in sterilizing the mediums. These results suggest the feasibility of using sodium hypochlorite to sterilize nutrients for in vitro cultivation of African Mahogany, dispensing with the use of autoclaving as a technique for sterilization of culture mediums.

Keywords: African Mahogany. Sterilization. Micropropagation.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
2.1	MOGNO AFRICANO .....	11
2.2	BIOTECNOLOGIA .....	13
2.3	AUTOCLAVAGEM.....	14
2.4	HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaClO) COMO ESTERELIZANTE....	14
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>16</b>
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	16
3.2	OBTENÇÃO DAS SEMENTES .....	17
3.3	DESINFECÇÃO DAS SEMENTES .....	17
3.4	MEIO DE CULTIVO .....	18
3.5	INOCULAÇÃO E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES.....	18
3.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS DIFERENTES DOSES DE NaClO	19
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>24</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>25</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Khaya*, pertencente à família Meliaceae, é composto por um importante grupo de espécies originárias de várias regiões africanas e, popularmente conhecidas pela designação de Mogno-Africano em território brasileiro (REIS et al., 2019). Tais espécies são importantes produtoras de madeira, entre elas a *Khaya senegalensis*, que é nativa da África Ocidental e Madagascar e pertencente à mesma família do Mogno-Brasileiro/Amazônico (*Swietenia macrophylla*), possuindo características semelhantes com relação à qualidade da madeira (LAMPRECHT, 1990; HUNG; TRUEMAN, 2011).

A área de ocorrência natural de *K. senegalensis* abrange diversas localidades africanas (LAMPRECHT, 1990; NIKIEMA; PASTENAK, 2008; PRACIAK et al., 2013). Ocorre em florestas de Savana, muitas vezes em locais úmidos e ao longo de cursos de água (NIKIEMA; PASTENAK, 2008).

O Mogno-Africano tem sido mundialmente reconhecido como madeira nobre e entre as principais aplicações se destacam a fabricação de móveis de luxo, adornos, entalhes, instrumentos musicais, faqueados, laminados, construção civil e naval, e em revestimentos internos e decorativos em várias partes do mundo (REIS et al., 2019).

É uma madeira que não sofre as limitações de corte e comercialização como sofre o Mogno-Brasileiro, e sua viabilidade econômica é atribuída às condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento (SILVA et al., 2016), por isso se torna uma alternativa de substituição da madeira brasileira, levando à preservação de florestas nativas e possibilitando o atendimento à alta demanda. Outra vantagem desta árvore é que ela não sofre com a *Hypsipyla grandella* (broca-das-ponteiras), uma praga que ataca o Mogno Brasileiro e que impede o seu cultivo comercial (EMBRAPA, 2013).

A busca de alternativas para a produção de mudas de Mogno tem sido um grande desafio para os pesquisadores florestais. A cultura de tecidos é uma técnica alternativa, pois pode ser usada como ferramenta para propagar espécies vegetais arbóreas que apresentam problemas que vão da produção, armazenamento, germinação até a patologia das sementes (COUTO, 2002).

Um dos problemas na produção do Mogno é a difícil execução de coletas de sementes devido ao porte da árvore e a perda da viabilidade em um curto espaço de tempo (LAMEIRA et al., 2006). O mesmo autor afirma ainda, que a micropropagação *in vitro* aparece como ferramenta importante para suprir as dificuldades encontradas para espécies que impedem uma rápida reposição natural, como o Mogno.

Entre as técnicas biotecnológicas, a micropropagação é a mais difundida e a que possibilita obter plantas do mesmo genótipo em larga escala e em um curto espaço de tempo, preservando a identidade do material genético e favorecendo o melhoramento da espécie (LAMEIRA et al., 2006).

No entanto, mesmo com todos os benefícios da técnica de micropropagação, a mesma é extremamente dispendiosa. Segundo Teixeira et al. (2008), a produção de mudas de plantas florestais e de outras espécies em laboratórios comerciais apresenta custo elevado, como resultado do alto valor das instalações e da energia necessária.

Ultimamente vem crescendo o interesse em se buscar novas opções que maximizem a produção, e uma delas tem sido a substituição da técnica de esterilização por autoclavagem por alguma outra de menor custo.

Araújo e Teixeira (1998) e Teixeira et al. (2005a; 2005b) levantaram informações que permitiram o estabelecimento de um protocolo de preparo de meios de cultura que utiliza, como esterilizante, o hipoclorito de sódio (NaClO). Em estudo, Teixeira et al. (2006) mostraram que o uso do referido protocolo, além de permitir a eliminação da contaminação introduzida no meio pelos explantes, resultou também no aumento do número de ramos e do peso da biomassa fresca.

O objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade da utilização de hipoclorito de sódio na esterilização dos frascos e como componente do meio de cultura para a esterilização durante a fase de germinação in vitro do Mogno-Africano.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 MOGNO AFRICANO**

*Khaya senegalensis* é uma espécie da família das Meliaceae nativa da África e ocorre em uma faixa paralela à linha do Equador entre 15 e 18° N (LAMPRECHT, 1990), que se estende do oceano Atlântico ao Índico, compreendendo o Senegal, sul do Sudão, norte dos Camarões e norte da Uganda (FAO, 1986; JOKER; GAMÉNÉ, 2012).

No comércio madeireiro brasileiro, a espécie é conhecida como Mogno-Africano, já em países africanos é conhecida como bissilon (Guiné Bissau), kahi (Guiné), khay (Senegal) no dialeto wolof (PINHEIRO et al., 2011).

O Mogno-Africano é uma árvore decídua de porte mediano, com 30,0 m a 35,00 m de altura quando crescendo em solos férteis e profundos, e de 15,0 m a 20,0 m nas savanas (NIKIEMA; PASTENAK, 2008; PRACIAK et al., 2013; OPUNI-FRIMPONG

et al., 2016) e diâmetro a altura do peito (DAP) de até 100 cm, com fuste sem ramificações (FAO, 1986; LAMPRECHT, 1990; JOKER; GAMÉNÉ, 2012).

A espécie possui casca cinzenta ou marrom acinzentada e copa ampla, arredondada e densa. As folhas são compostas, paripenadas, de cor verde brilhante na face superior e cinzenta na inferior. As flores são pequenas e brancas, unissexuais, numerosas, dispostas em panículas longo-pedunculadas. O período de floração ocorre pouco antes da estação seca, de dezembro a abril e as flores são polinizadas por insetos (NIKIEMA; PASTERNAK, 2008; LAMPRECHT, 1990). Os frutos são acinzentados, constituídos por cápsulas lenhosas e globulares, geralmente com 5 ou 6 cm de diâmetro.

A produção de sementes ocorre a partir de 15-25 anos de idade, sendo estas marrons e achatadas, com cerca de 2 cm x 2,5 cm e margens aladas. São recalcitrantes e sua dispersão é anemófila, quando frescas, chegam a 90,0% de germinação. Duas semanas após a coleta a porcentagem de germinação diminui drasticamente (LEMMENS, 2008; MAROYI, 2008; NIKIEMA; PASTERNAK, 2008; OPUNI-FRIMPONG, 2008).

As primeiras sementes do Mogno-Africano chegaram ao Brasil na década de 70 e a sua adaptabilidade em território nacional, devido as excelentes condições de clima e solos favoráveis a esta espécie, chamou a atenção de vários produtores que a partir de então iniciaram o cultivo que logo se espalhou por várias regiões do país (NATIVIDADE, 2016).

Atualmente, no Brasil têm sido amplamente comercializadas mudas seminais de Mogno-Africano, mas há também plantios de clones, selecionados por algumas empresas/viveiros, que estão em fase de teste. Há plantios de *K. senegalensis* em várias regiões, em especial, em áreas com solos arenosos e sujeitos à deficiência hídrica, sendo esta, a espécie que mais se destaca sob essas condições (REIS et al., 2019).

Os cultivos de Mogno-Africano (*K. anthotheca*, *K. grandifoliola*, *K. ivorensis* e *K. senegalensis*) têm crescido de forma significativa nos últimos anos. Estima-se que a área plantada em território brasileiro já tenha ultrapassado 37 mil hectares em 2018, o que torna o Brasil, muito provavelmente, o maior plantador desse gênero, seguido da Austrália com 14 mil hectares de *K. senegalensis* (REIS et al., 2019).

De acordo com França et al. (2015), a madeira de *K. senegalensis* possui massa específica básica média (0,59 g cm<sup>-3</sup>), sendo indicada para produção de assoalho, construção leve e embarcações. A madeira de *Khaya senegalensis* é considerada mais

resistente ao ataque dos fungos de podridão branca e mole e ao ataque dos cupins de madeira seca e aos subterrâneos em relação à madeira de *K. ivorensis*.

A madeira do Mogno-Africano possui propriedades físicas e mecânicas, aparência e trabalhabilidade similares ao Mogno-Brasileiro, são resistentes à broca de ponteiro (*Hypsipyla grandella*), a qual inviabiliza cultivo e exploração econômica aos mognos do gênero *Swietenia* no Brasil, sua madeira tem uso consolidado e elevada cotação no mercado internacional, e o fato de haver considerável redução de exemplares nativos e/ou proibição de corte dos mognos, seja o brasileiro e/ou africano, segundo Reis et al. (2019) essas características tem justificado o investimento em plantios de Mogno-Africano em áreas tropicais mundiais.

Portanto, a substituição da madeira de Mogno-Brasileiro, em suas diversas aplicações, por outras espécies, cujas características sejam similares às suas propriedades físicas e mecânicas, à trabalhabilidade e aos caracteres gerais é uma alternativa viável (PINHEIRO et al., 2011).

## 2.2 BIOTECNOLOGIA

Avanços em biotecnologia possibilitaram o desenvolvimento de mudas de espécies florestais com qualidade em menor tempo. A raridade e a dificuldade de obter mudas e fazer a propagação de Mogno, por exemplo, são os principais fatores do alto custo desta planta. Com a multiplicação e germinação *in vitro* o problema pode ser amenizado (EPAMIG, 2009).

Segundo Altafin et al. (2003), a produção de mudas em laboratórios tem como vantagem o fato de produzir um maior número de mudas em um curto espaço de tempo, bem diferentes dos métodos tradicionais, a exemplo disto, existem espécies que apresentam o primeiro florescimento de 5 a 7 anos. Com a produção em laboratório este tempo de florescimento diminui para 3 a 4 anos, em seguida tem-se como vantagem a alta qualidade fitossanitária, sendo a mesma livre de doenças.

A redução de custos em laboratórios comerciais é um dos principais objetivos que envolvem a cultura de tecidos, pois a produção de mudas tem seu custo elevado, devido principalmente ao custo das instalações e energia necessária para autoclavagem de meio de cultura e vidrarias (TEIXEIRA et al., 2008).

Neste contexto, duas características importantes para se obter uma instalação mais econômica seria a substituição da técnica de autoclavagem por alguma outra mais

econômica, bem como o uso da luz solar na iluminação da sala de crescimento de plantas (PONCE et al., 2000).

### 2.3 AUTOCLAVAGEM

A autoclavagem como técnica de esterilização de vidraria, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório (BURGER, 1988), consiste de uma operação dispendiosa, devido ao elevado custo do equipamento e do elevado consumo de energia. Além disso, a autoclavagem pode levar à decomposição de componentes do meio de cultura, como a sacarose (BALL, 1953<sup>1</sup> *apud* TEIXEIRA et al., 2008).

A decomposição da sacarose, em altas temperaturas, resulta na formação de composto furfural, que é tóxico e impede o crescimento e desenvolvimento celular (RIBEIRO et al. 2009). Por estes motivos, a substituição desta técnica de esterilização por alguma outra menos dispendiosa seria altamente desejável.

Alguns autores, como Yanagawa et al. (1995)<sup>2</sup> *apud* Ribeiro (2006) utilizaram hipoclorito de sódio para esterilizar o interior do frasco de cultura após a inoculação das sementes e o mesmo ou água oxigenada para esterilizar o meio de cultura e obtiveram sucesso na inoculação de sementes de orquídeas.

Araújo e Teixeira (1998)<sup>3</sup> *apud* Ribeiro (2006) e Teixeira et al. (2005a; 2005b), utilizam o hipoclorito de sódio em concentrações muito baixas para evitar a degradação de determinados componentes do meio de cultura, baixar os custos de manutenção e consumo da autoclave e reduzir o tempo para esterilização de meios nutritivos.

### 2.4 HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaClO) COMO ESTERELIZANTE

O emprego de NaClO, tendo como fonte Água Sanitária Comercial (ASC) na esterilização de meios de cultura e desinfestação de sementes, mostra-se um método

---

<sup>1</sup> BALL, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lancaster-PA, v. 80, p. 409-411, 1953.

<sup>2</sup> YANAGAWA, T et al. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent in vitro contamination. **Lyndleyana**, Palm Beach, Fla, v. 10, p. 33-36, 1995.

<sup>3</sup> ARAUJO, M.C.; TEIXEIRA, S.L. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de micro-ondas. **In**: Reunião de programação de pesquisas do ccta, 1998, Campos dos Goytacazes, RJ. Campos dos Goytacazes, RJ: CCTA/UENF, 1998.

eficiente e de baixo custo quando comparada à autoclavagem e ao uso da câmara de fluxo laminar (RODRIGUÊS, 2010), além de ser um produto de fácil aquisição (FONTES, 2011).

Ribeiro (2006), ao realizar uma comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem, determinou que a adoção do procedimento de esterilização química dispensa o uso da autoclave para esterilização de meios nutritivos e vidrarias. Concentrações superiores que 0,003% de cloro ativo total em meios de cultura asseguram total esterilização do meio nutritivo.

Yanagawa et al. (1995), testaram a esterilização do meio de cultura para repicagem de explantes da espécie *Bletilla striata* e concluíram que a concentração de 0,105 g.L<sup>-1</sup> de NaClO (3,57 ml.L<sup>-1</sup> de ASC), aplicados ao meio de cultura, e 5,24 g.L<sup>-1</sup> de NaClO (178 ml.L<sup>-1</sup> de ASC), aplicados sobre as mudas na forma de spray, não ocasionaram perda de crescimento das plântulas.

Alvarez-Pardo et al. (2006), estudando a influência do NaClO, variando a concentração (4,2 e 8,4 g.L<sup>-1</sup>) e o tempo de exposição (de 5 a 60 min), sobre a germinação de sementes de orquídeas, observaram que, aumentando-se a concentração e o tempo de exposição das sementes ao desinfestante químico, ocorreu redução na germinação. Apenas as espécies *Brassavola tuberculata*, *Cattleya intermedia* e *C. pallida* foram mais tolerantes aos efeitos da desinfestação. O tratamento com 4,2 g.L<sup>-1</sup> de NaClO (143 ml.L<sup>-1</sup> de ASC), por 5 min, mostrou-se, para a maioria das espécies, mais eficaz no controle da contaminação, com 87 % de germinação das sementes.

Rodrigues et al. (2011) encontraram resultados positivos para a germinação de *Cattleya intermedia* com o uso de ASC nas menores doses. Os autores utilizaram doses variando entre 1,2 e 4 800 mg.L<sup>-1</sup> de NaClO (0,04 e 163 ml.L<sup>-1</sup> de ASC) e verificaram que o NaClO mostrou-se eficiente no controle da contaminação; contudo, o aumento da dose prejudicou a germinação das sementes.

Fontes (2011) constatou que, apesar da baixa contaminação, o uso do desinfestante químico mostrou-se fitotóxico para a germinação de sementes de *Laelia tenebrosa* Rolfe. O autor verificou ainda que, doses crescentes de ASC (40 ml.L<sup>-1</sup>) ocasionaram diminuição da proporção de plântulas viáveis para o recultivo e da produção de matéria seca e fresca. Em média, nos tratamentos que passaram pela autoclavagem obteve-se 85% de germinação, enquanto que, nos tratamentos

desinfestados com a menor dose da ASC (2 ml.L<sup>-1</sup>) apenas 69% das sementes germinaram.

Ribeiro et al. (2011), obtiveram meios de cultura sem contaminação microbiana utilizando concentrações entre 30 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de NaClO (1,02 e 1,70 ml.L<sup>-1</sup> de ASC), para o crescimento in vitro de *Sequoia sempervirens*. O aumento da concentração de NaClO proporcionou explantes com menor número de ramos. Os explantes cultivados em meio de cultura esterilizados com concentração entre 30 e 40 mg.L<sup>-1</sup> de NaClO (1,02 e 1,36 ml.L<sup>-1</sup> de ASC) apresentaram maior número de ramos, porém menor comprimento destes em relação ao meio de cultura autoclavado.

Ao realizar trabalhos com esterilização química de meio de cultura no cultivo in vitro de Antúrio, Cardoso (2009) verificou que o uso da esterilização química é uma alternativa adequada ao sistema de autoclavagem, e o dióxido de cloro a 0,005% (volume/volume) pode ser empregado para o processo de esterilização com eficiência semelhante à da autoclavagem. Não havendo problemas de fitotoxicidade, e a qualidade das mudas de Antúrio cultivadas em meio com dióxido de cloro foi mantida em comparação àquelas cultivadas em meio autoclavado.

Cox et al. (2003), realizaram a desinfestação de esporos de Samambaia (*Schizaea dichotoma*) utilizando hipoclorito de sódio, streptomina e a combinação de ambos, visando a otimização dos procedimentos de desinfestação para posterior germinação e crescimento in vitro do vegetal. Três tratamentos diferentes foram empregados: (T1) 1% de NaClO (volume/volume); (T2) 200 µg/mL de streptomina e (T3) 1% de NaClO + 200 µg/mL de streptomina (1:1 volume/volume). Os resultados observados para os três tratamentos foram similares, apesar de o tempo de contato dos esporos com os desinfestantes (5 minutos) ainda não ter sido o ideal para uma desinfestação completa.

Não foram relatados trabalhos com a suplementação de NaClO no meio de cultivo em substituição à técnica de autoclavagem de sementes e plântulas de Mogno-Africano.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO**

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais (IFMG) campus São João Evangelista. O referido município encontra-se localizado na bacia hidrográfica do Rio Doce (sub – bacia do Rio São Nicolau), região Centro Nordeste do Estado de

Minas Gerais, apresentados os seguintes dados de localização: coordenadas 18°32'52" de latitude Sul e 42°45'48" de longitude Oeste (CORREIA et al., 2013).

### 3.2 OBTENÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de Mogno-Africano utilizadas no estudo foram adquiridas comercialmente, não sendo possível determinar o tempo que as mesmas se mantiveram expostas no solo até o momento da coleta.

Após seu recebimento as mesmas foram levadas para o laboratório de culturas de tecidos vegetais para serem submetidas aos respectivos tratamentos.

### 3.3 DESINFECÇÃO DAS SEMENTES

Para a desinfecção das sementes foi utilizado tratamento de esterilização segundo Couto et al. (2004) e Filho et al. (1998), o qual consiste em submeter as sementes com tegumentos à imersão em água corrente durante 15 minutos.

Dentro de Câmara de Fluxo Laminar as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial a 50% (v/v) por 20 minutos, e em seguida imersas em álcool 70 % (v/v) por 1 minuto. Posteriormente as sementes foram mergulhadas em NaClO com 3 gotas de detergente Tween 20 durante 30 minutos, conforme a figura 1, e, por último, após o procedimento de desinfecção, as sementes foram submetidas a um triplo enxágue com água destilada para a remoção de resíduos das soluções desinfectantes.

**Figura 1:** Sementes de Mogno Africano mergulhadas em hipoclorito de sódio com gotas de detergente Tween 20.



Fonte: FREITAS, L.

### 3.4 MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) meia força, o qual contém 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Synth), 0,1 g.L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Vetec), 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico (Alphatec) e os sais MS. O meio não foi autoclavado, sendo que cada frasco recebeu Água Sanitária Comercial (ASC) com concentração de cloro ativo na faixa de 2 a 2,5% de cloro ativo.

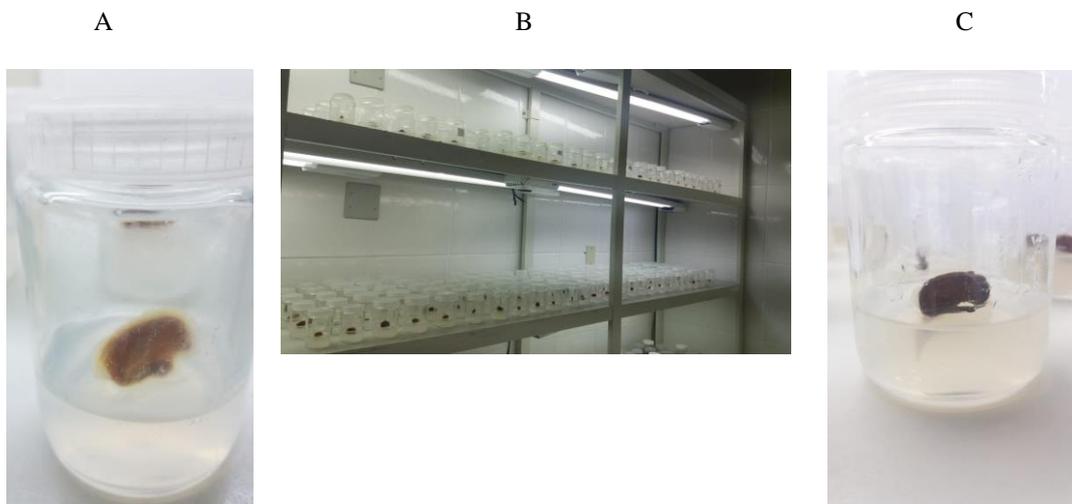
Para os cinco primeiros tratamentos a água utilizada no preparo dos meios de cultura foi a água apenas destilada, portanto os tratamentos ficaram distribuídos da seguinte forma: T1 → 0 ml.L<sup>-1</sup> de ASC; T2 → 2,0 ml.L<sup>-1</sup> de ASC; T3 → 5,0 ml.L<sup>-1</sup> de ASC; T4 → 10,0 ml.L<sup>-1</sup> de ASC e T5 → 20,0 ml.L<sup>-1</sup> de ASC, onde nenhum dos meios foi autoclavado.

Para os outros cinco tratamentos a água utilizada no preparo dos meios de cultura foi a água destilada autoclavada, portanto os tratamentos ficaram distribuídos da seguinte forma: T6 → 0 ml.L<sup>-1</sup> de ASC; T7 → 2,0 ml.L<sup>-1</sup> de ASC; T8 → 5,0 ml.L<sup>-1</sup> de ASC; T9 → 10,0 ml.L<sup>-1</sup> de e T10 → 20,0 ml.L<sup>-1</sup> de ASC, onde nenhum dos meios foi autoclavado.

### 3.5 INOCULAÇÃO E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

As sementes foram transferidas para frascos contendo 30 mL de meio de cultura com a parte côncava voltada para baixo de acordo com Couto (2002), em seguida os frascos foram lacrados e identificados. Após inoculação, os frascos contendo sementes de Mogno-Africano foram levados à sala de crescimento para a incubação com temperatura de 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz, permanecendo por um período de 60 dias. O critério adotado para considerar como semente germinada foi a protrusão da radícula.

**Figura 2:** A) Semente inoculada com a parte côncava voltada para baixo; B) Frascos contendo sementes de Mogno-Africano na sala de crescimento; C) Semente de Mogno-Africano germinada.



Fonte: FREITAS, L.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS DIFERENTES DOSES DE NaClO

Avaliaram-se os efeitos das diferentes dosagens de hipoclorito de sódio sobre a contaminação do meio, e procedeu-se com a contagem diária dos frascos contaminados por fungos ou bactérias, utilizando como critério de avaliação a presença de micélio de qualquer cor ou exudação, respectivamente; e índice de germinação, sendo feita as contagens diárias das plântulas que germinaram durante 60 dias, adotando-se a metodologia recomendada por Maguire (1962).

Após 60 dias de inoculação das sementes, realizaram-se as seguintes análises: índice de germinação e índice de contaminação, expressos em porcentagens (%).

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Ao fim da coleta e tabulação dos dados deu-se início a descrição e tratamento dos dados computados utilizando-se de comparações e métodos estatísticos. Na instalação do experimento o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em fatorial 5x2, sendo 5 níveis da variável concentrações de hipoclorito de sódio e 2 níveis da água utilizada no processo (destilada autoclavada e destilada). Cada tratamento tem 5 repetições contendo 5 sementes cada, totalizando 250 unidades amostrais. Os ensaios tiveram os dados submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de 60 dias de incubação dos tratamentos, os resultados da contaminação para variável água destilada foram submetidos à análise de variância, conforme a tabela 1.

Tabela 1- Análise de variância da contaminação para variável água destilada.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
<b>Trat</b>	4	32,24	8,06	18,529	0,0000
<b>Rep</b>	4	9,04	2,26	5,195	0,0071
<b>erro</b>	16	6,96	0,43		
<b>Total corrigido</b>	24	48,24			
<b>CV (%) =</b>	44,56				
<b>Média geral:</b>	1,48				Número de observações: 25

Fonte: FREITAS, L.

Os resultados da análise sugerem que há diferença estatística entre os tratamentos, portanto, estes foram submetidos ao teste de média para comparação dos mesmos, (conforme a tabela 2). Para sua realização foi feita a média ponderada dos tratamentos, sendo calculada através do somatório da quantidade de frascos contaminados multiplicados pelo peso 5 (quantidade de frascos em cada repetição), sendo este valor dividido por 25 (quantidade total de frascos em cada tratamento).

Tabela 2- Resultados da contaminação para a variável água destilada.

<b>Tratamentos</b>	<b>Média ponderada</b>	<b>Resultados do teste</b>
<b>1</b>	3,2	a1
<b>2</b>	2,4	a1
<b>3</b>	1	a1
<b>4</b>	0,6	a2
<b>5</b>	0,2	a2

\*Teste de Tukey a 95% de probabilidade. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra e número, são estatisticamente iguais. Fonte: FREITAS, L.

Os tratamentos 1, 2 e 3, em que se testaram as menores doses de hipoclorito de sódio, diferiram estatisticamente dos tratamentos 4 e 5, em que foram testadas as maiores doses de hipoclorito de sódio e estes apresentaram os melhores resultados (0,6 e 0,2, respectivamente) na contaminação dos meios.

Em estudo realizado por Ribeiro (2006), onde avaliou a influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura de *Eucalyptus pellita*, também nas maiores doses utilizadas foi onde não se observou nenhuma contaminação. As

concentrações que poderiam ser utilizadas estariam entre 0,005 e 0,007% (v/v) de cloro ativo total no meio.

Em relação à germinação das sementes de Mogno-Africano a análise de variância mostrou que não houve diferença estatística entre os tratamentos utilizados.

Fontes (2011) utilizou doses de ASC (Água Sanitária Comercial) como esterilizante do meio de cultura para avaliar seu uso na germinação de orquídeas. As doses adicionadas foram 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 35,0; e 38,0 ml.L<sup>-1</sup>. O autor encontrou resultados significativamente maiores para a germinação quando utilizou maiores doses de hipoclorito em relação aos recipientes em que os meios receberam menores doses.

Os resultados da contaminação para variável água destilada autoclavada foram submetidos à análise de variância, conforme a tabela 3.

Tabela 3- Análise de variância da contaminação para variável água destilada autoclavada.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
<b>Trat</b>	4	46,96	11,74	9,468	0,0004
<b>Rep</b>	4	3,76	0,94	0,758	0,5675
<b>erro</b>	16	19,84	1,24		
<b>Total corrigido</b>	24	70,56			
<b>CV (%) =</b>	49,71				
<b>Média geral:</b>	2,24				

Número de observações: 25

Fonte: FREITAS, L.

Os resultados da análise sugerem que há diferença estatística entre os tratamentos, portanto, estes foram submetidos ao teste de média para comparação dos mesmos, (conforme a tabela 4).

Tabela 4- Resultados da contaminação para a variável água destilada autoclavada.

<b>Tratamentos</b>	<b>Média ponderada</b>	<b>Resultados do teste</b>
<b>6</b>	4,4	a1
<b>7</b>	3,2	a1 a2
<b>8</b>	1,8	a2 a3
<b>9</b>	0,8	a3
<b>10</b>	1	a3

\*Teste de Tukey a 95% de probabilidade. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra e número, são estatisticamente iguais. Fonte: FREITAS, L.

O nível de contaminação variou estatisticamente entre os tratamentos quando a água utilizada no preparo do meio foi a destilada autoclavada. Nota-se que, a maior média de contaminação foi encontrada no tratamento 6 (4,4), em que não se utilizou

hipoclorito de sódio e a menor média de contaminação foi encontrada no tratamento 9 (0,8) em que se utilizou 10 ml.L<sup>-1</sup> de hipoclorito de sódio.

Da mesma forma que não houve diferença significativa entre os tratamentos na germinação para a variável água destilada, a análise de variância mostrou que não houve diferença também para os tratamentos em que se utilizou água destilada autoclavada no preparo do meio.

Couto et al. (2004) utilizando hipoclorito de sódio apenas na desinfestação de sementes de *Swietenia macrophylla* (Mogno-Brasileiro) encontraram maiores germinações (48%) quando utilizaram maiores concentrações de cloro ativo (2,5% e 5,0%).

Os resultados das porcentagens de contaminação e germinação analisados para as variáveis água destilada sem autoclavagem e água destilada autoclavada estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 5- Resultados da contaminação e germinação para as variáveis água apenas destilada e água destilada autoclavada.

<b>Tratamento</b>	<b>Contaminação (%)</b>	<b>Germinação (%)</b>
<b>1</b>	64	4
<b>2</b>	48	12
<b>3</b>	20	28
<b>4</b>	12	20
<b>5</b>	4	28
<b>6</b>	88	8
<b>7</b>	64	04
<b>8</b>	36	12
<b>9</b>	16	20
<b>10</b>	20	4

Fonte: FREITAS, L.

Nota-se que, nos tratamentos em que se utilizaram água destilada não autoclavada no preparo do meio de cultura (1 a 5) as porcentagens de contaminação foram menores quando comparados aos tratamentos em que se utilizou água destilada autoclavada (6 a 10) e nos tratamentos em que não se utilizou o hipoclorito de sódio como desinfectante (tratamento 1 e 6) foram encontradas as maiores contaminações (64 e 88%).

Couto et al. (2004), encontraram resultados semelhantes avaliando a germinação in vitro de *Swietenia macrophylla* (Mogno-Brasileiro), onde as maiores taxas de contaminações foram obtidas nos tratamentos em que as sementes não receberam a

desinfestação com hipoclorito de sódio, apresentando as maiores taxas de contaminação com 89 e 67%, valores estes semelhantes ao verificado nesse trabalho.

A germinação apresentou porcentagens relativamente baixas para ambas variáveis de água. Esse resultado pode estar relacionado com a rápida perda de viabilidade das sementes após a queda e o período de exposição no solo até o momento da coleta.

Estes baixos valores podem ainda estar relacionados com o tempo de exposição das sementes ao desinfestante químico, como descrito por Alvarez-Pardo et al. (2006), onde apenas as espécies *Brassavola tuberculata*, *Cattleya intermedia* e *C. pallida* foram mais tolerantes aos efeitos da desinfestação.

Outra hipótese seria a mesma constatada por Fontes (2011) ao trabalhar com a germinação de sementes de *Laelia tenebrosa* Rolfe em que hipoclorito de sódio tenha sido fitotóxico para a germinação das sementes.

Comparando-se as duas variáveis, água destilada e água destilada autoclavada com relação à contaminação, os resultados da análise de variância demonstraram significância entre os tratamentos:

Tabela 6- Análise de variância comparando a contaminação entre a água destilada e água destilada autoclavada

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
<b>Trat</b>	1	7,22	7,22	5,54	0,0271
<b>Rep</b>	24	87,52	3,64	2,798	0,0073
<b>erro</b>	24	31,28	1,3		
<b>Total corrigido</b>	49	126,02			
<b>CV (%) =</b>	61,38				
<b>Média geral:</b>	1,86			Número de observações: 50	

Fonte: FREITAS, L.

A adoção do procedimento de esterilização química dispensa o uso de autoclave para esterilização da água utilizada no preparo dos meios, assim como na esterilização dos próprios meios nutritivos.

Os resultados deste trabalho reforçam a conclusão de Teixeira et al. (2006) sobre a viabilidade do uso do hipoclorito de sódio, como esterilizante em cultura de tecidos vegetais, desde que se adotem as demais medidas de assepsia constantes desse novo protocolo de preparo do meio de cultura.

Comparando-se as duas variáveis, água destilada e água destilada autoclavada com relação à germinação, os resultados da análise de variância também demonstraram significância entre os tratamentos:

Tabela 7- Análise de variância comparando a germinação entre a água destilada e água destilada autoclavada

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
<b>Trat</b>	1	2,88	2,88	4,288	0,0493
<b>Rep</b>	24	19,88	0,82	1,233	0,3058
<b>erro</b>	24	16,12	0,67		
<b>Total corrigido</b>	49	38,88			
<b>CV (%) =</b>	120,52				
<b>Média geral:</b>	0,68			Número de observações: 50	

Fonte: FREITAS, L.

Apesar da baixa germinação, esta apresentou melhores resultados quando se utilizou água destilada no preparo dos meios de cultura, validando assim o uso da mesma no preparo e condicionamento dos meios de cultura.

## 5 CONCLUSÕES

A utilização do hipoclorito de sódio como componente do meio de cultura para fins de esterilização durante a fase de germinação *in vitro* é viável.

As doses de ASC mais eficientes na esterilização foram 10 e 20 ml.L<sup>-1</sup> quando utilizada água destilada não autoclavada no preparo dos mesmos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALTAFIN, V.L. et al. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal**. Espírito Santo do Pinhal: Unipinhal, 14p, 2003.
- ALVAREZ-PARDO, V. M.; FERREIRA, A. G.; NUNES, V. F. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchid from Southern Brazil. **Hort. Bras.**, 24:217-220, 2006.
- BURGER, D.W. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. **HortScience**, Alexandria-VA, v. 23, p. 1066-1068, 1988.
- CARDOSO, J. C. Esterilização química de meio de cultura no cultivo *in vitro* de antúrio. **Pesq. Agropec. Bras.**, 44:785-788, 2009.
- CORREIA, A. C. G. et al. Volume de substrato e idade: influência no desempenho de mudas clonais de eucalipto após replantio. **Cerne**, v. 19, n. 2, p. 185-191, 2013.
- COUTO, J. M. F. **Germinação e morfogênese *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. 2002. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.
- COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.28, n.5, p.633-642, 2004.
- COX, J.; BHATIA, P.; ASHWATH, N. *In vitro* spore germination of the fern *Schizaea dichotoma*. **Scientia Horticulture**, 97: 369-378. 2003.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo e manejo de mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Joanne Régis Costa, Ronaldo Ribeiro de Moraes, Lian da Silva Campos. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013.
- EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **Biotecnologia**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 7-13, nov/dez, 2009.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Forestry Department. Databook on endangered tree and shrub species and their provenances. Rome, 1986.
- FILHO, A. N. K.; GRAÇA, M. E. C.; JUNIO, A. G. **Micropropagação do Mogno: desinfestação e germinação**. Embrapa, n.65, p.2-3, dez. 1998.
- FONTES, A. A. **Desinfestação química para semeio e recultivo *in vitro* de orquídeas e sua influência sobre a nutrição das plântulas**. 2011. 35 p. Dissertação (Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas)- UFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

- FRANÇA, T. S. F. A. et al. BARAÚNA, E. E. P. Características anatômicas e propriedades físico-mecânicas das madeiras de duas espécies de mogno-africano. **Cerne**, v. 21, n. 4, p. 633-640, 2015.
- HUNG, C. D.; TRUEMAN S. J. **In vitro propagation of the African mahogany *Khaya senegalensis***. The New Forest, London, v. 42, n. 1, p. 117-130, 2011.
- JOKER, D.; GAMÉNÉ, S. ***Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss.** Humlebaek: Danida Forest Seed Center. 2 p. 2012.
- LAMEIRA, O. et al. Efeito de substratos a germinação in vitro de Mogno (*Swietenia macrophylla* KING). **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 15-19, 2006.
- LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos trópicos: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas- possibilidades e métodos de aproveitamento sustentado**. Rossdorf: TZ – Verl-Ges. (GTZ), 1990.
- LEMMENS, R. H. M. J. *Khaya ivorensis*. **In: LOUPPE, D.; OTENG-AMOAKO, A. A.; BRINK, M.** Plant resources of tropical Africa. Wageningen: PROTA Foundation, 2008.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.
- MAROYI, A. *Khaya anthotheca*. **In: LOUPPE, D.; OTENG-AMOAKO, A. A.; BRINK, M.** (Ed.). Plant resources of Tropical Africa. Wageningen: PROTA Foundation, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NATIVIDADE, G. S. **Análise do cenário da produção de mogno africano (*Khaya ivorensi*) no cerrado**. 2016. 45 p. Monografia (Bacharel em Gestão de Agronegócios)-UnB, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2016.
- NIKIEMA, A.; PASTERNAK, D. *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. **In: LOUPPE, D.; OTENG-AMOAKO, A. A.; BRINK, M.** (Ed.). Plant Resources Tropical (PROTA). Wageningen, Netherlands, 2008.
- OPUNI-FRIMPONG, E. et al. **Managing mahogany plantation in the tropics: field guide for farmers**. Kumasi/Ghana: Forest Institute of Ghana, 95 p., 2016.
- PINHEIRO A. L. et al. **Ecologia, silvicultura e tecnologia de utilização dos mognos-africanos (*Khaya spp*)**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Agrossilvicultura, 102 p. 2011.
- PINHEIRO, A. L. et al. **Ecologia, silvicultura e tecnologia de utilização dos mognos-africanos (*Khaya spp*)**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Agrossilvicultura, p. 12, 25, 64, 69, 72, 73, 98. 2011.

PONCE, J. N. P.; CASTELLÁ, M. S.; PÉREZ, P. O. Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. **Bioteología Vegetal**. Villa Clara, n. 1, p. 3-12, 2000.

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

REIS, C. A. F.; OLIVEIRA, E. B.; SANTOS, A. M. **Mogno-africano (Khaya spp.): atualidades e perspectivas do cultivo no Brasil**. Brasília, DF. 378 p.: il. color. ; 21 x 25 cm. Embrapa, 2019.

RIBEIRO, A. P. O. et al. **The influence of flask sealing on in vitro morphogenesis of eqplant (*Solanum melongena* L.)**. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 45:421-428, 2009.

RIBEIRO, J. M. **Comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem**. 58p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)- Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, D. B. **Cultivo in vitro de *Sequoia sempervirens* L. em meio de nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio**. Ci. Flor., 21:77-82, 2011.

RODRIGUÊS, D. T. **Propagação in vitro de orquídeas sem a utilização de câmara de fluxo lamilar**. 50 p. Tese (Doutorado)-UFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

RODRIGUES, D. T. et al. In vitro germination os *Cattleya intermedia* R. Graham by means of chemical disinfection and without laminar flow. **Prop. Orn. Plants**, 11:119-124, 2011.

SILVA, L. F. D. et al. Hipsometric, Volumetric and Growth Equations for *khaya ivorensis*, Planted in Pirapora. **Floreta e Ambiente**, v. 23, n. 3, p. 326-368, 2016.

TEIXEIRA, S.L. et al. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais, pela combinação de esterilizantes químicos e forno de micro-ondas. **Revista CERES**, Viçosa – MG, v. 52, p. 343-349, 2005a.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação in vitro de *Eucalyptus pellita*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 185-191, abr.-jun., 2008.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. **Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Holanda, v. 86, n. 3, p. 375-378, 2006.

TEIXEIRA, S.L.; SOUSA, R.T.S.; TEIXEIRA, M.T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de micro-ondas. **Revista CERES**, Viçosa – MG, v. 52, 2005b.