

**INDUÇÃO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE
CALOS E ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR
DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**

KELCEANE DE SOUZA AZEVEDO

2003

KELCEANE DE SOUZA AZEVEDO

**INDUÇÃO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS E
ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DE COPAÍBA
(*Copaifera langsdorffii* Desf.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Azevedo, Kelceane de Souza

Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) / Kelceane de Souza Azevedo. -- Lavras : UFLA, 2003.

86 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Copaíba. 2. *Copaifera langsdorffii*. 3. Calo. 4. Anatomia foliar. 5. Micropropagação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.97332

KELCEANE DE SOUZA AZEVEDO

**INDUÇÃO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS E
ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DE COPAÍBA
(*Copaifera langsdorffii* Desf.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 27 de fevereiro de 2003.

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva UFLA

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro UFLA

Prof. Renato Paiva, PhD.
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A minha irmã, Kelcelene de Souza Azevedo (*in memoriam*),
e a minha avó, Olindina Alves Martins (*in memoriam*),
as quais gostaria muito que estivessem aqui para
desfrutar deste momento de alegria em minha vida

DEDICO

Ao meu grande pai, José Rodrigues de Azevedo;
À minha mãe, Antônia Rosinete de Souza Azevedo;
Ao meu filho querido, João Paulo Azevedo Chaves;
Aos meus irmãos, Josicley, Josideime e Luís Gustavo; e
Ao Carlos, meu grande companheiro.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela vida e por tudo que me destes até hoje.

Aos pais meus, Azevedo e Rosinete, que sempre foram os maiores idealizadores e que sempre fizeram de tudo para que eu pudesse chegar onde estou, pelos muitos conselhos e carinhos durante esta longa caminhada.

Ao meu filho, João Paulo, minha maior fonte de inspiração, pelo qual fiz tudo isso, e também pelos momentos maravilhosos que passamos juntos em Lavras.

Aos meus irmãos, Josicley, Josideime e Luís Gustavo, a minha cunhada Gleicy e à sobrinha Letícia, que com certeza sempre torceram por mim. A toda a minha família pelo apoio em todos os momentos.

Ao Carlos, o companheiro de todas as horas, agradeço pelo o amor, carinho e respeito incondicional sempre demonstrados, o qual sempre me incentivou desde o primeiro minuto e participou de cada etapa na conquista deste objetivo. Em especial às suas filhas, Sulyane e Ariane, que compreenderam a ausência do pai, e também a toda sua família, mãe e irmãos.

Ao meu orientador, Prof. Renato Paiva, pelos ensinamentos, apoio e incentivo durante todo o curso.

À minha co-orientadora, Prof. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, e ao co-orientador, Prof. Moacir Pasqual, pelo convívio e apoio durante o curso.

Ao Prof. Evaristo Mauro de Castro pela participação na banca examinadora e pelas sugestões na dissertação.

Ao professor José Darlan Ramos por ter sido um conselheiro nas horas mais difíceis e nos momentos de angústia.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos - Fisiologia Vegetal, Mauro, Cíntia, Fernanda, Rodrigo, Gustavo, Raniere e Artiaga, pela ajuda na

realização dos experimentos. E também a Ednabel, Raírys, Patrícia, Breno e Cristiano pelo agradável convívio.

Aos amigos da turma de mestrado, Tatiana, Ildon e Chrystiane, que foram as pessoas que primeiro conheci no curso e das quais sentirei saudades.

À amigas do curso de Fisiologia Vegetal, Marina, Cláudia, Daniela, Anne e Patrícia, pela amizade. E também ao Evaristo, Tanham, Joel e Lena, pelo apoio.

À Tâmara Cláudia de Araújo Gomes, pesquisadora da Embrapa, que foi a primeira pessoa a me incentivar no caminho da pesquisa científica, e que sempre acreditou em meu sucesso.

À minha grande amiga Lúcia e a toda sua família, por acolher a mim e ao meu filho sempre com muito carinho.

À minha grande amiga Orlane, que mesmo distante sempre me incentivou e acreditou em meu trabalho.

Aos amigos de república, Tadário, Sérvulo e Renato, pela acolhida quando da minha chegada em Lavras e pelo agradável convívio.

À família do Henrique, Nô, Pâmela e Geovana, que sempre me ajudaram e apoiaram, principalmente com meu filho, obrigada pelo carinho.

Aos amigos Alcivânia e Reginaldo por todos os momentos compartilhados juntos.

A Nazaré (Preta), que sempre cuidou do meu filho e de mim com muito carinho e dedicação.

À Universidade Federal de Lavras e à CAPES pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

E a todos os professores e amigos que de alguma, estiveram presentes nessa etapa da minha vida.

BIOGRAFIA

KELCEANE DE SOUZA AZEVEDO nasceu em Rio Branco-Acre, no dia 26 de setembro de 1977; ingressou no curso de Agronomia no ano de 1995, e a partir do 4º período foi bolsista de iniciação científica na Embrapa Acre, trabalhando com manejo de solos e posteriormente com a cultura do café. Formou-se em Agronomia pela Universidade Federal do Acre, no ano de 2001, e neste mesmo ano ingressou no curso de mestrado em Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, na qual trabalhou com a propagação *in vitro* de copaíba.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO I.....	1
INDUÇÃO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS E ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DE COPAÍBA (<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.)	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Descrição botânica da espécie.....	2
2.2 Usos da espécie e formas de extração do óleo de copaíba	4
2.3 Germinação de sementes.....	5
2.4 Cultura <i>in vitro</i>	6
2.4.1 Germinação <i>in vitro</i>	7
2.4.2 Indução de brotações.....	7
2.4.3 Cultura de calos.....	9
2.5 Aspectos anatômicos.....	10
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO II	16
GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES E ALGUNS ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DE PLANTAS DE COPAÍBA EM DIFERENTES AMBIENTES	16
1 RESUMO	16
2 ABSTRACT	17
3 INTRODUÇÃO	18
4 REFERENCIAL TEÓRICO	18

4.1 Germinação <i>in vitro</i>	19
4.2 Aspectos anatômicos.....	21
5 MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de copaíba	22
5.2 Efeito da sacarose e giberelina na germinação <i>in vitro</i> de sementes.....	24
5.3 Estudos de algumas características anatômicas do tecido foliar de plantas de copaíba cultivada em diferentes ambientes	25
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6.1 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de copaíba	26
6.2 Efeito da sacarose e giberelina na germinação <i>in vitro</i> de sementes.....	27
6.3 Estudos de algumas características anatômicas do tecido foliar de plantas de copaíba cultivada em diferentes ambientes	31
7 CONCLUSÕES.....	37
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
CAPÍTULO III.....	42
INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DE COPAÍBA (<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.)	42
1 RESUMO	42
2 ABSTRACT.....	43
3 INTRODUÇÃO	44
4 REFERENCIAL TEÓRICO	44
5 MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1 Coleta e assepsia dos explantes.....	47
5.2 Inoculação dos explantes.....	47
5.3 Análises estatística	48
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1 Tamanho de brotações.....	48
6.2 Biomassa seca de brotações	51

7 CONCLUSÕES.....	53
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CAPÍTULO IV.....	56
INDUÇÃO DE CALOGÊNESE E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DOS CALOS FORMADOS EM EXPLANTES FOLIARES DE COPAÍBA (<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.).....	56
1 RESUMO.....	56
2 ABSTRACT.....	58
3 INTRODUÇÃO.....	59
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	59
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
5.1 Efeito do 2,4-D e BAP na indução de calos em explantes foliares de copaíba.....	63
5.1.1 Coleta e assepsia dos explantes.....	63
5.1.2 Inoculação dos explantes.....	63
5.1.3 Análises estatística.....	64
5.2 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de copaíba.....	64
5.3 Análises bioquímicas de calos de copaíba.....	65
5.3.1 Quantificação de açúcares solúveis totais.....	66
5.3.2 Quantificação de açúcares redutores.....	66
5.3.3 Quantificação de proteínas totais.....	67
5.3.4 Quantificação de aminoácidos.....	67
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
6.1 Efeito do 2,4-D e BAP na indução de calos em explantes foliares de copaíba.....	68
6.2 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de copaíba.....	69
6.3 Análises bioquímicas de calos de copaíba.....	73
6.3.1 Quantificação de açúcares solúveis totais.....	73

6.3.2	Quantificação de açúcares redutores	74
6.3.3	Quantificação de proteínas totais	75
6.3.4	Quantificação de aminoácidos	77
7	CONCLUSÕES.....	79
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
	ANEXOS	84

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Aspecto geral da copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.) e seus principais órgãos vegetativos 03
FIGURA 2	Germinação <i>in vitro</i> de sementes de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) inoculadas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose na ausência e presença de 2,0 mg L ⁻¹ GA ₃ 28
FIGURA 3	Sementes de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) germinadas 15 dias após a inoculação em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose na ausência e presença de 2,0 mg L ⁻¹ GA ₃ 30
FIGURA 4	Seções transversais da lâmina foliar de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) cultivada <i>in vitro</i> , em sala de crescimento e campo. 32
FIGURA 5	Seções transversais da lâmina foliar de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) cultivada <i>in vitro</i> , em sala de crescimento e campo, evidenciando as células secretoras. 35
FIGURA 6	Seções transversais da nervura principal de folhas de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>), oriundas de plantas cultivadas <i>in vitro</i> , em sala de crescimento e campo. 36
FIGURA 7	Efeito da concentração de BAP sobre o tamanho de brotações (cm) formadas em segmentos nodais de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) em meio MS e WPM. 49
FIGURA 8	Efeito de níveis crescentes de BAP sobre a biomassa seca de brotações formadas em segmentos nodais de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) inoculados em meio MS e WPM. UFLA, Lavras – MG, 2002. 51

FIGURA 9	Aspecto geral de calos de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) formados a partir de segmentos foliares inoculados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP + 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D. UFLA, Lavras – MG, 2002.	70
FIGURA 10	Curva de crescimento de calos de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) formados a partir de segmentos foliares inoculados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP + 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002	71
FIGURA 11	Teores de açúcares solúveis totais em calos de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) formados com base em segmentos foliares inoculados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP + 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002.	73
FIGURA 12	Teores de açúcares redutores em calos de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) formados com base em segmentos foliares inoculados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP + 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002.	74
FIGURA 13	Teores de proteínas totais em calos de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) formados com base em segmentos foliares inoculados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP + 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002	76
FIGURA 14	Teores de aminoácidos em calos de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) formados com base em segmentos foliares inoculados <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com 1,0 mg L ⁻¹ de BAP + 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002	78

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1	Percentagem de germinação de sementes não escarificadas e escarificadas e provenientes de Rio Branco (AC) (<i>Copaifera multijuga</i>) e Minas Gerais (MG) (<i>Copaifera langsdorffii</i>), germinadas <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras – MG, 2001 28
TABELA 2	Espessura média (μm) da epiderme adaxial (EAD), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), epiderme abaxial (EAB) e limbo (LB) foliar de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) em diferentes ambientes de cultivo. UFLA, Lavras – MG, 2002..... 33
TABELA 3	Peso da biomassa fresca em calos (g) de copaíba (<i>Copaifera langsdorffii</i>) formados a partir de segmentos foliares e inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. UFLA, Lavras – MG, 2002. 68

RESUMO

AZEVEDO, Kelceane de Souza. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A copaíba é uma árvore amazônica de grande potencial econômico em razão de seus princípios medicinais, mas apresenta dificuldades de propagação devido à presença de dormência tegumentar nas sementes. Objetivou-se neste trabalho promover a germinação *in vitro* de sementes, induzir a analisar bioquimicamente calos formados em segmentos foliares através da quantificação dos teores de proteína total, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores e estudar aspectos da anatomia foliar de plantas de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) cultivadas *in vitro*, em sala de crescimento e no campo. Foi observado maior germinação em sementes escarificadas inoculadas *in vitro* em meio MS na ausência de sacarose e presença de 2,0 mg L⁻¹ de GA₃. No estudo anatômico verificou-se diferença nas estruturas foliares das plantas cultivadas em relação aos ambientes de cultivo. Os parênquimas paliçádico e esponjoso apresentaram-se mais espessos em plantas cultivadas no campo, seguido pelo cultivo *in vitro*. Maiores brotações são obtidas inoculando-se segmentos nodais em meio MS suplementado com 0,86 mg L⁻¹ de BAP. Maior formação de calos a partir de explantes foliares é obtido utilizando 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. A curva de crescimento de calos apresentou padrão sigmóide com as cinco fases de crescimento. O crescimento máximo de calos ocorreu no 154º dia de inoculação. Os maiores teores de proteína total e aminoácidos foram observados até o 56º dia de inoculação, período coincidente com a fase lag de crescimento. Os maiores teores de açúcares solúveis totais foram observados no 84º dia de cultivo, correspondendo às fases lag e exponencial. Para açúcares redutores, o dia de inoculação apresentou-se com os maiores teores.

*Comitê Orientador: Renato Paiva (Orientador) - UFLA, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-orientadora) – UFLA, Moacir Pasqual (Co-orientador) – UFLA.

ABSTRACT

AZEVEDO, Kelceane de Souza. **Induction and biochemical analysis of callus and aspects of leaf anatomy of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf).** 2003. 86p. Dissertation (Masters in Agronomy / Crop Science)– Federal University of Lavras, Lavras. *

The copaiba is an Amazon tree of economical potential due to its medicinal properties. However, it presents propagation difficulties due to presence of seed coat dormancy. The objective of this work was to promote *in vitro* seed germination, to induce and biochemically analyze callus formed from leaf segments through the quantification of total proteins, amino acids, soluble and reducing sugars and to study some aspects of leaf anatomy of *Copaifera langsdorffii* Desf. plants cultivated *in vitro*, in a growth room and in the field. It was observed higher germination of scarified seeds inoculated *in vitro* in MS medium in the absence of sucrose and presence of 2.0 mg L^{-1} GA₃. The anatomy studies indicated differences in the leaf structures according to the cultivation environment. The palisade as well as the spongy parenchyma was thicker in plants cultivated in the field followed by the *in vitro* condition. Higher shoots are obtained inoculating nodal segments in MS supplemented with 0.86 mg L^{-1} BAP. Higher callus formation from leaf explants was obtained using 1.0 mg L^{-1} BAP + 2.0 mg L^{-1} 2,4-D. The callus growth curve presented a sigmoid shape with five growth phases. Maximum callus growth occurred 154 days after explants inoculation. Higher levels of total proteins and amino acids were observed 56 days after inoculation, period which coincided with the lag growth phase. Higher levels of soluble sugars were observed 84 days after inoculation corresponding to the lag and exponential phases. For reducing sugars, higher levels were observed at the inoculation day.

*Guidance Committee: Renato Paiva (Adviser) - UFLA, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser) - UFLA, Moacir Pasqual (Co-adviser) - UFLA.

CAPÍTULO I

INDUÇÃO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE CALOS E ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii* Desf.)

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, o interesse em pesquisas científicas relacionadas a métodos de propagação, identificação de compostos químicos e aplicações terapêuticas das plantas medicinais tem se intensificado. Assim sendo, a realização de estudos em plantas que empiricamente são utilizadas na medicina popular torna-se imprescindível para selecionar as espécies que detenham propriedades medicinais.

Uma espécie de grande potencial econômico, em razão principalmente do uso medicinal, é a copaíba (*Copaifera langsdorffii*), de cujo tronco é extraído um óleo-resina muito utilizado na medicina popular para a cura de diversas enfermidades, atuando como antiinflamatório, diurético, estimulante, laxativo e cicatrizante (Maciel et al., 2002).

A copaíba (*Copaifera langsdorffii*) é uma espécie arbórea de grande porte, podendo atingir até 35 metros de altura. O gênero *Copaifera* está amplamente distribuído na América do Sul, mas é na região amazônica que há maior ocorrência da espécie, principalmente em matas de terra firme (Sebrae, 1998). Sua propagação é realizada por sementes, as quais apresentam dormência

causada pelo tegumento (Machado et al., 1992). A germinação sem escarificação ocorre de maneira desuniforme e se estende até 70 dias (Almeida et al., 1998).

Baseado nesse contexto, e a partir da carência de estudos sobre métodos alternativos de cultivo de copaíba, tem-se a cultura de tecidos, por exemplo, que pode ser utilizada como processo alternativo de propagação, possibilitando a obtenção de um grande número de mudas em curto espaço de tempo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição botânica da espécie

A copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.), também conhecida como bálsamo, óleo de copaíba, pau d'óleo e copaúba, é uma espécie arbórea de grande porte podendo alcançar até 35 metros de altura. Apresenta ampla distribuição geográfica na América do Sul, principalmente na Argentina, Bolívia e Brasil. Sua distribuição no Brasil é relatada principalmente nos estados do Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Tocantins (Almeida et al., 1998), além da Amazônia Ocidental (Amazonas, Acre e Rondônia) (Sebrae, 1998).

É uma espécie com grande plasticidade ecológica (capacidade de adaptação a diferentes ambientes), sendo encontrada nas seguintes regiões fitoecológicas do Brasil: cerrado, caatinga/mata seca, campos gerais/rupestres, floresta ombrófila densa¹, floresta ombrófila mista², floresta semidecidual³, entre outras (Carvalho, 1994).

¹ Vegetação da Amazônia, que se caracteriza por elevada temperatura e alta precipitação durante todo o ano;

² Vegetação do planalto meridional, com predominância de árvores de Araucária;

³ Vegetação que perde parte das folhas em determinada época do ano.

O gênero *Copaifera* pertence à família Leguminosae-Caesalpinoideae, sendo caracterizado principalmente por árvores composta de folhas alternas com 2 a 6 pares de folíolos, com inflorescência branca, às vezes ligeiramente rosadas, e sem pétalas. Seus frutos são legumes deiscentes com 3,5 a 4,0 cm, ovóides, com um a única semente, negra, oval, e cobertas com um arilo amarelo (Almeida et al., 1998).

A figura 1 ilustra um exemplar de copaíba, com detalhes de sua inflorescência, fruto, sementes, tronco e tipo de madeira.



FIGURA 1. Aspecto geral da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) e seus principais órgãos vegetativos (Lorenzi, 1992). UFLA, Lavras - MG, 2003.

O florescimento ocorre durante os meses de dezembro a março. Os frutos amadurecem entre agosto e setembro, com a planta quase desprovida de folhagem (Lorenzi, 1992). A espécie tem como prováveis polinizadores as abelhas.

2.2 Usos da espécie e formas de extração do óleo de copaíba

Dentre as várias utilidades da copaíba destaca-se seu uso madeireiro, medicinal, cosmético e industrial (Nelson, 1987; Carvalho, 1994). Sua utilização madeireira ocorre em função de características como superfície lisa e lustrosa, textura média e uniforme, durável e de alta resistência a ataque de xilófagos, e apresenta baixa permeabilidade, sendo, por isso, largamente utilizada na construção civil e naval (Carvalho, 1994).

Porém, atualmente seu uso está mais voltado para a área medicinal, com a utilização do óleo-resina contra enfermidades como hemoptises (problemas pulmonares), sinusite, como antiinflamatório, anti-séptico, anti-reumático, para tratamento de asma e laxante (Almeida et al., 1998).

O óleo de copaíba se encontra dentro de canais secretores, na região do caule, e se prolonga até o lenho, onde existe em grande abundância, formando bolsas (Sebrae, 1998).

A forma de extração tradicional do óleo é com a derrubada da árvore, mas atualmente a extração racional vem sendo bastante difundida, a qual consiste em perfurar o tronco da árvore com um trado e colocar um cano no orifício, por onde o óleo é expelido e coletado em galões. Terminada a coleta, é feita a vedação do orifício, para evitar a entrada de insetos e patógenos transmissores de doenças (Alencar, 1982).

Em testes de produção, foi verificada a máxima produção de 3,5 litros de óleo por planta, porém este volume varia conforme a espécie, o tipo de solo, a disponibilidade de água, a época do ano e a herança genética (Sebrae, 1998).

2.3 Germinação de sementes

Segundo Labouriau (1983) a germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado botanicamente como a retomada do crescimento do embrião, com conseqüente rompimento do tegumento pela radícula. Do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica (Borges & Rena, 1993).

Para que ocorra a germinação em sementes viáveis é necessário que os fatores externos como disponibilidade de água; oxigênio e luz sejam favoráveis. Porém, quando estes fatores se encontram presentes e não ocorre a germinação, as sementes são denominadas “dormentes”.

A dormência apresentada pela maioria das espécies vegetais tem como causas mais comuns a imaturidade fisiológica do embrião, a impermeabilidade do tegumento e a presença de inibidores (Raven et al., 2001).

A dormência por impermeabilidade à água ocorre principalmente em sementes da família *Leguminosae*. Popinigis (1985) afirma que a impermeabilidade do tegumento à água, característica comum em espécies da família *Leguminosae*, é devida à camada de células paliçádicas.

A dormência de sementes pela presença de inibidores também pode dificultar a propagação das espécies. Em copaíba, o principal processo de propagação é através de sementes, as quais apresentam dormência ocasional causada pela deposição do inibidor cumarina no tegumento da semente.

Na tentativa de quebrar essa dormência, Machado et al. (1992) relatam que a escarificação das sementes com lixa promoveu 90% de germinação, inclusive com redução no número de dias para a germinação. Taxas inferiores foram obtidas por Borges et al. (1982) usando a estratificação por 15 dias ou manutenção em água, com 57% e 76% de germinação, respectivamente.

2.4 Cultura *in vitro*

Uma das alternativas mais recentes para a propagação de plantas é a cultura de tecidos, sendo sua utilização de grande importância em espécies ameaçadas de extinção, principalmente em plantas que são de difícil propagação pelos métodos convencionais.

A cultura de tecidos consiste num processo, por meio do qual fragmentos de tecido vivo (explante) são isolados de uma planta e cultivados assepticamente *in vitro* em um meio nutritivo previamente definido (Mantell et al., 1994). Dentre suas vantagens em relação à propagação convencional estão a obtenção de um grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes, a utilização de menor espaço físico e a redução do tempo para a produção das mudas (Grattapaglia & Machado, 1998).

As espécies lenhosas são mais difíceis de se propagar *in vitro* em comparação com as espécies herbáceas. Segundo Pierik (1987), isto é devido principalmente ao fato de as plantas lenhosas apresentarem, de modo geral, maior variabilidade genética, menor capacidade regenerativa dos tecidos, dormência das gemas, maior concentração de fenóis, além da dificuldade de manutenção de algumas plantas matrizes em casa-de-vegetação.

Para algumas espécies lenhosas, a propagação *in vitro* tem sido realizada com sucesso, entre elas a erva-baleira (*Cordia verbenácea*) (Lameira, 1997), a sucupira-branca (*Pterodon pubescens*) (Coelho, 1999), a *Annona glabra* (Deccetti, 2000), o pessegueiro (*Prunus* sp.) (Silveira et al., 2001), o cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) (Santos, 2001), o açaizeiro (*Euterpe oleracea*) (Ledo et al., 2001), a amoreira preta (*Rubus idaeus*) (Erig et al., 2002) e jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) (Sabá, et al., 2002).

2.4.1 Germinação *in vitro*

Através da técnica de cultura de tecido, uma semente, ou mesmo um tecido vegetal, é inoculado em um meio de cultura contendo elementos capazes de permitir o crescimento e o desenvolvimento de uma plântula *in vitro*, como sais orgânicos, açúcares, aminoácidos e reguladores de crescimento.

O crescimento celular e a morfogênese *in vitro* podem ser influenciados pelas propriedades osmóticas do meio de cultura, sendo os açúcares os principais componentes reguladores (George, 1993).

A sacarose é o principal carboidrato utilizado nos meios nutritivos e está relacionada à regulação osmótica. A redução, inibição ou favorecimento da germinação e/ou crescimento *in vitro* de espécies lenhosas a partir de soluções de diferentes concentrações de sacarose foi observada para algumas espécies, como moreira (*Maclura tinctoria*) (Gomes, 1999), mangabeira (Pinheiro et al., 2001) e morangueiro (Calvete et al., 2002).

Para a germinação podemos destacar ainda o uso das giberelinas, sendo que para algumas espécies, as giberelinas aceleram a germinação e a emergência, enquanto para outras, indicam pequena resposta ou nenhum efeito. Carvalho (1997) e Deccetti (2000) observaram que o ácido giberélico não contribuiu para acelerar a germinação *in vitro* de sementes de cafeeiro e *Annona glabra*, respectivamente.

2.4.2 Indução de brotações

Na micropropagação de plantas, o método mais desejável é a organogênese ou cauligênese adventícia (diferenciação de brotos adventícios), pois proporciona a obtenção rápida de um grande número de propágulos.

Nas diversas fases da micropropagação, o meio de cultura utilizado deve proporcionar à planta os nutrientes necessários ao metabolismo das células e os

fatores de crescimento, responsáveis pela diferenciação de brotações e raízes (Schuch & Peters, 1993).

O meio de cultura mais utilizado em cultura de tecidos tem sido o MS (Murashige & Skoog, 1962), porém, Lloyd & McCown (1980) desenvolveram um meio de cultura para brotações de plantas lenhosas denominado WPM (Woody Plant Medium), que atualmente vem sendo bastante utilizado.

Um outro fator determinante no crescimento e diferenciação de órgãos é o regulador de crescimento, sendo que, em geral, uma elevada relação citocinina/auxina promove a formação de brotos, ao passo que uma elevada relação auxina/citocinina favorece a diferenciação de raízes (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para a multiplicação da parte aérea e indução de gemas adventícias em cultura de tecidos, o regulador de crescimento mais utilizado é a citocinina BAP (Benzilaminopurina) (Pasqual et al., 2001). A utilização do BAP na multiplicação de brotações é relatada através de trabalhos para espécie como pau-santo (*Kielmeyera coriacea*), para a qual onde altas taxas de multiplicações de brotações foram possíveis com o uso de 0,5 mg L⁻¹ de BAP (Pinto et al., 1994).

Em plantas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), Pereira et al. (1995) observaram maiores números de brotações em meio de cultura suplementado com 3,0 mg L⁻¹ de BAP. Resultados semelhantes foram obtidos em sucupira branca (*Pterodon pubescens*) por Coelho (1999). E ainda, para a proliferação de brotos de jojoba (*Simmondsia chinensis*), a utilização de concentrações variando de 1,0 a 8,0 mg L⁻¹ de BAP proporcionaram maiores números de brotos por explante inicial (Roussos et al., 1999).

2.4.2 Cultura de calos

Os calos são tecidos constituídos por uma massa de células com um baixo nível de organização, que se multiplicam desordenadamente, em resposta às injúrias químicas ou físicas e que possuem a capacidade de se diferenciar em tecido ou órgãos (Torres & Caldas, 1990).

Para a indução de calos, pode-se utilizar qualquer parte da planta, porém tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em ápices caulinares, gemas axilares e em regiões meristemáticas, são mais adequadas (Handro & Floh, 1990).

A calogênese é diretamente influenciada por fatores como o tamanho do explante, a composição do meio de cultura, os reguladores de crescimento e a idade da planta mãe, sendo a frequência de sobrevivência e a velocidade de desenvolvimento dos calos diretamente relacionadas com o seu tamanho inicial (Murashige, 1974).

Segundo Pierik (1987), a formação de calos pode ser promovida por concentrações semelhantes de auxinas e citocininas, podendo variar em função do balanço hormonal de cada espécie.

Em relação à formação e ao desenvolvimento dos calos, é relatada a divisão em três estágios, indução, divisão e diferenciação, que são verificados através da curva de crescimento de calos, a qual geralmente pode apresentar até cinco fases: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (George, 1993).

A determinação sobre quando o calo deve ser transferido para um meio de cultura novo e a sua utilização em suspensão celular visando à produção de metabólitos secundários, são verificadas através do estudo cinético do crescimento do calo (Bonilla, 2002). Estudos neste sentido foram realizados através do estabelecimento da curva de crescimento de calos em espécies como erva-baleira (Lameira, 1997), lechieira (*Litchi chinensis*) (Mesquita, 1999),

castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) (Serra et al., 2000), cafeeiro (Santos, 2001) e chá-de-bugre (*Rudgea virbunoides*) (Bonilla, 2002).

Associado à curva de crescimento faz-se a realização de estudos bioquímicos que caracterizam as mudanças que ocorrem nas diferentes fases do crescimento do calo. Nesses estudos são analisados os teores de proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores presentes nos calos.

2.5 Aspectos anatômicos

Em estudos histológicos de órgãos vegetativos de plantas propagadas *in vitro*, foi verificado que os mesmos apresentavam tecidos e estruturas pouco diferenciados se comparados com plantas cultivadas em casa-de-vegetação (Fabbri et al., 1986; Fidelis, 1998; Santos, 2001; Fráguas, 2003); e que modificações ocorridas nas folhas são as mais significativas, pois afetam principalmente a fotossíntese e as trocas gasosas, quando estas passarem para fase de aclimatização (Deberg & Maene, 1984).

Modificações anatômicas resultantes do cultivo *in vitro* dificultam sobremaneira o estabelecimento *ex vitro* das espécies. Segundo Patton & Jones (1989), essas modificações são fatores importantes na determinação das respostas fisiológicas das plantas.

Fabbri et al. (1986) verificaram apenas uma camada de células paliçádicas nas folhas de brotações de morangueiro micropropagadas, ao invés de duas ou três comumente encontradas, e maiores espaços intercelulares no mesofilo quando comparadas com folhas de plantas desenvolvidas em casa-de-vegetação. O mesmo foi observado para cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) (Santos, 2001) e figueira (*Ficus carica*) (Fráguas, 2003).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne- Leguminosa, na Amazônia central. 1 – Germinação. **Acta Amazônica**, v.11, n.1, p.3-11, 1982.

ALMEIDA, S.P. et al. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. p.129-135.

BONILLA, M.G.O. **Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.** 2002. 162p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BORGES, E.E.L. et al. Comparação de métodos de quebra de dormência em sementes de copaíba. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.4, n.1, 1982.

BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES – Comitê Técnico de Sementes Florestais. 1993, Cap.3, p.83-135.

CALVETE, E.O.; KAMPF, A.N.; SUZIN, M. Concentrações de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p. 186-191, 2002.

CARVALHO, G.R. **Germinação de sementes e aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro***. 1997. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CARVALHO, P.E. **Espécies florestas brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa-SPI, 1994. 640p.

COELHO, M.C.F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de Sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.)]**. 1999. 119p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant. Gembloux. **Parasítica**, v.40, p.69-75, 1984.

DECETTI, S.F.C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ERIG, A.C.; ROSSI, A.; FORTES, G.R.L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*Rubus idaeus* l.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 765-770, 2002.

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S.K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.28, n.4, p.331-337, May 1986.

FIDELIS, A. **Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (mama-cadela) uma espécie considerada medicinal.** 1998. 109p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FRÁGUAS, C.B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes.** 2003. 110p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: parte 1 – the technology.** 2.ed. Edington: Exergetics, 1993. 574p.

GOMES G.A.C. **Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*).** 1999. 92p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p. 183-260.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRE, A.C.; CALDAS, L.S (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 203-212.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes.** Washington: OEA, 1983. 174p.

- LAMEIRA, O.A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LEDO, A.S. et al. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 468-472, dez. 2001.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, v.30, p. 421-427, 1980.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: SP.: Plantarum, 1992. p.152.
- MACIEL, M.A. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.
- MACHADO, J.W.B.; ALENCAR, F.O.C.C.; RODRIGUES, M.G.P. **Árvores de Brasília**. Brasília: GDF, 1992. 100p.
- MANTELL, S.H.; MATTHUS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.
- MESQUITA, A.C. **Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos**. 1999. 67p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MURASHIGE, T. Plant regeneration through tissue cultures. **Annual Review Plant Physiology**, Washington, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.1, n.15, p.473-497, 1962.
- NELSON, B.W. O gênero *Copaifera*, fonte de óleo-resina. In: PRANCE, G.T. **Botânica econômica de algumas espécies amazônicas; abiu, açaí, araçá-boi, buriti, camu-camu; cubiu, copaíba, piaçava, patauí, pupunha, sorva e tucumã**. Manaus: [s.n.], 1987. 898p. Relatório de Pós-graduação em Botânica.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p. 66-69.

PATTON, L.; JONES, M.B. Some relationships between leaf anatomy and photosynthetic characteristics of willows. **New Phytologist**, Cambridge, v.111, n.4, p.657-661, Apr. 1989.

PEREIRA, A.M.S. et al. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.42, p. 295-297, 1995.

PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. 344p.

PINHEIRO, C.S.R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

PINTO, J.E.B.P. et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p. 867-873, 1994.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília. AGIPLAN, 1985. p.39-93.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001. p.533-547.

ROUSSOS, P.A. et al. Rapid multiplication of jojoba seedlings by *in vitro* culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.57, p. 133-137, 1999.

SABÁ, R.T. et al. Micropropagação do Jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n,1, p. 106-109, 2002.

SANTOS, C.G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SERRA, A.G.P.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*

H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.4, p.833-840, out./dez. 2000.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS DO ACRE.
Copaíba: produtos potenciais da Amazônia, Brasília,
MMA/SUFRAMA/SEBRAE/GTA, 1998. 28p.

SCHUCH, M.W; PETERS, J.A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh) e meguni (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.4, p. 433-437, abr. 1993.

SILVEIRA, C.A.P. et al. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de bap em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 488-492, dez. 2001.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPQ, 1990. 443 p.

CAPÍTULO II

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E ALGUNS ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DE PLANTAS DE COPAÍBA EM DIFERENTES AMBIENTES

1 RESUMO

AZEVEDO, Kelceane de Souza. Germinação *in vitro* de sementes e alguns aspectos da anatomia foliar de plantas de copaíba em diferentes ambientes. In: _____. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf)**. 2003. Cap. 2, p.16-41. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O estabelecimento *in vitro* de sementes de copaíba através de cultura de tecidos é uma alternativa para a produção em larga escala de mudas. O objetivo deste trabalho foi promover a germinação *in vitro* de sementes e caracterizar alguns aspectos da anatomia foliar de plantas de copaíba cultivadas *in vitro*, em sala de crescimento e no campo. Sementes escarificadas foram inoculadas em meio MS contendo diferentes concentrações de sacarose, na presença e ausência de GA₃. A escarificação das sementes promoveu maior percentual de germinação *in vitro*. O aumento na concentração de sacarose no meio de cultura reduziu a percentagem de germinação *in vitro*, sendo maior na ausência de sacarose. O uso de GA₃ no meio de cultura não influenciou a germinação. As estruturas foliares desenvolvidas em plantas cultivadas *in vitro*, em sala de crescimento e no campo apresentaram organizações anatômicas diferentes. Os parênquimas paliçádico e esponjoso apresentaram-se mais espessos em plantas cultivadas no campo, seguidas do cultivo *in vitro*. Foi observada a presença de canais secretores nas folhas de plantas cultivadas nos três ambientes analisados.

* Comitê Orientador: Renato Paiva (Orientador) – UFLA, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-orientadora) – UFLA, Moacir Pasqual (Co-orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

AZEVEDO, Kelceane de Souza. *In vitro* seed germination and some aspects of leaf anatomy of copaiba plants cultivated in different environments. In: _____. **Induction and biochemical analysis of callus and aspects of leaf anatomy of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf)**. 2003. Cap. 2, p.16-41. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science)– Federal University of Lavras, Lavras.*

The *in vitro* establishment of copaiba seeds through tissue culture is an alternative for the production of plantlets in large scale. The objective of this work was to promote *in vitro* seed germination and to study some aspects of leaf anatomy of *Copaifera langsdorffii* Desf. plants cultivated *in vitro*, in a growth room and in the field. Scarified seeds inoculated in MS supplemented with different concentrations of sucrose in the absence and presence of GA₃. The scarification of seeds promoted higher *in vitro* germination. The increase in sucrose concentration reduced *in vitro* germination with higher percentage being observed in its absence. The use of GA₃ had no influence on *in vitro* germination. The anatomy studies indicated differences in the leaf structures according to the plant cultivation environment. The palisade as well as the spongy parenchyma was thicker in plants cultivated in the field followed by the *in vitro* condition. It was observed the presence of secretory channels in the plants cultivated in all analyzed environments.

*Guidance Committee: Renato Paiva (Adviser) - UFLA, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser) – UFLA, Moacir Pasqual (Co-adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Devido à copaíba apresentar grande valor econômico, medicinal e madeireiro, a copaíba encontra-se atualmente na lista das espécies ameaçadas de extinção, principalmente pela sua utilização madeireira, a exploração de forma predatória ameaça a sobrevivência da espécie. Uma das principais barreiras para a implantação e conservação dos recursos genéticos de copaíba é a inexistência do domínio de seu cultivo e de estudos sobre as condições de armazenamento de suas sementes.

Considerando os problemas existentes na propagação da copaíba, a cultura de tecido surge como uma importante ferramenta de propagação, a qual vem sendo utilizada com sucesso em várias espécies. Através da germinação *in vitro*, algumas condições, como de disponibilidade de água, temperatura, luminosidade e concentrações de reguladores de crescimento, podem ser fornecidas às sementes de maneira adequada, visando aumentar a porcentagem de germinação.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

A ocorrência de dormência em espécies florestais tem dificultado sua propagação comercial, sendo as causas mais comuns da dormência em sementes a imaturidade fisiológica do embrião, a impermeabilidade do tegumento e a presença de inibidores (Raven et al., 2001).

O mecanismo da dormência em condições naturais é de grande valor, por ser um mecanismo de sobrevivência das espécies (Popinigis, 1985). Entretanto, passa a ser um problema quando as sementes são utilizadas em

produção de mudas, em razão do longo tempo necessário para que ocorra a germinação.

Sementes de copaíba apresentam dormência, causada pela deposição da cumarina no tegumento. Na tentativa de quebra dessa dormência, Borges et al. (1982) obtiveram taxas de germinação, em sementes de copaíba, entre 57% e 76% com a estratificação por 15 dias ou manutenção das sementes em água. Segundo Machado et al. (1992), essa dormência causada pelo tegumento pode ser facilmente eliminada por meio de escarificação, e através deste tratamento a germinação pode ocorrer entre 17 e 20 dias após a sementeira, com taxas de 90%.

4.1 Germinação *in vitro*

Atualmente, em espécies que apresentam dificuldades de propagação sexuada, utilizam-se métodos alternativos que proporcionam maior produção de mudas e conseqüentemente, a perpetuação da espécie.

Através da técnica de cultura de tecido, uma semente ou mesmo um tecido vegetal é inoculado em um meio de cultura contendo elementos como sais orgânicos, açúcares, aminoácidos e reguladores de crescimento, capazes de permitir o crescimento e desenvolvimento de uma plântula *in vitro*.

Segundo George (1993), as soluções de sais inorgânicos e açúcares, que compõem os meios de cultura de tecidos, não possuem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese através de propriedades osmóticas.

O potencial osmótico do meio de cultura é relacionado à concentração de solutos, sendo os açúcares os principais componentes reguladores do potencial do meio.

Os efeitos de soluções de diferentes concentrações de sacarose sobre a germinação e/ou crescimento *in vitro* de espécies lenhosas como *Orobanchaegyptica* e Citros são relatados por Junior Gmitter & Moore (1986).

Outro fator que regula a germinação da semente são os fitohormônios. A presença de tais substâncias assume características críticas sob certas condições ambientais (Aguilar et al., 1993). Sabe-se hoje que as giberelinas têm um papel chave na germinação de sementes, estando envolvidas tanto na quebra da dormência como no controle da hidrólise de reservas, da qual depende o embrião em crescimento.

Enquanto para diversas espécies as giberelinas aceleram a germinação e a emergência, para outras indicam pequena resposta ou nenhum efeito. Takaki et al. (1979) observaram que sementes tratadas com ácido giberélico (GA₃) apresentaram redução na percentagem de germinação proporcionada pelo regulador. Para esses autores, a redução ocorreu devido ao aumento na atividade de algumas enzimas (celulases e outras) que atuam degradando o material da parede celular. Carvalho (1997) observou que o ácido giberélico não contribuiu para acelerar a germinação *in vitro* de sementes de cafeeiro e o desenvolvimento final das mudas.

Deccetti (2000) obteve redução na taxa de germinação de sementes de *Annona glabra* quando utilizou 2,0 mg L⁻¹ de GA₃ no meio de cultura, e principalmente quando este foi associado a altas concentrações de sacarose.

Pinheiro et al. (2001), trabalhando com sementes de mangaba (*Hancornia speciosa*, Gomez), concluiu que a melhor percentagem de germinação foi obtida utilizando sementes desprovidas de tegumento, cultivadas em meio de cultura sem a adição de sacarose e na presença de 0,1 mg L⁻¹ de GA₃.

Castro et al. (2002) não obteve diferenças significativas para germinação *in vitro* de sementes de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber) com o uso de 3,0 mg L⁻¹ de GA₃ no meio de cultura.

4.2 Aspectos anatômicos

As características anatômicas foliares são fatores importantes na determinação das respostas fisiológicas como a fotossíntese líquida (Patton & Jones, 1989). As variações nas características morfológicas e anatômicas em folhas de plantas desenvolvidas em diferentes níveis de radiação têm sido relatadas para algumas espécies (Kaufmann & Troendle, 1981; Smith et al., 1997).

Plantas micropropagadas são freqüentemente afetadas por excessiva presença de fatores do meio de cultura que conduzem à degeneração metabólica e fisiológica nos tecidos. Assim, as desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas ocorridas nos tecidos de plantas cultivadas *in vitro* têm sido descritas sob diversas terminologias, como vitrificação, translucidez, hiperhidratação, suculência e transparência (Ziv, 1991).

As desordens anatômicas são menos significativas em caule e raízes, porém sua manifestação nas folhas afeta os dois principais processos realizados por estas, isto é, a fotossíntese e as trocas gasosas (Deberg & Maene, 1984). Essas modificações impedem o estabelecimento *ex vitro* de plantas provenientes de cultura de tecidos.

Em estudos histológicos de órgãos vegetativos de plantas propagadas *in vitro* foi verificado que os mesmos apresentavam tecidos e estruturas pouco diferenciados se comparados com plantas cultivadas em casa-de-vegetação (Fabbri et al., 1986; Fidelis, 1998; Santos, 2001; Fráguas, 2003).

A formação de apenas uma camada de células paliçádicas em plantas micropropagadas, em comparação com as plantas desenvolvidas em casa-de-vegetação, as quais normalmente apresentam de duas a três camadas de células paliçádicas, além de maiores espaços intercelulares no mesofilo, vem sendo relatado, para algumas espécies como cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), (Santos, 2001) e figueira (*Ficus carica*) (Fráguas, 2003).

A desordem estrutural e funcional das folhas *in vitro* é resultado de complexos e múltiplos fatores do meio de cultura, implicando em baixa sobrevivência das plantas quando transferidas para o ambiente *ex vitro*, sendo assim, a compreensão e o conhecimento destes fatores pode fornecer instrumentos para o controle da morfogênese de plantas cultivadas *in vitro* (Short et al., 1985; Ziv, 1988).

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção do melhor método para germinação *in vitro* de sementes de *Copaifera langsdorffii* e caracterizar alguns aspectos de anatomia foliar de plantas obtidas a partir de sementes e cultivadas em três diferentes ambientes (*in vitro*, em sala de crescimento e campo).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de germinação foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal e a realização dos cortes anatômicos, no Laboratório de Anatomia Vegetal, ambos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

5.1 Germinação *in vitro* de sementes de copaíba

Para a realização do experimento, utilizaram-se sementes de planta adulta de *Copaifera multijuga*, coletadas em Rio Branco (Acre), e sementes de

Copaifera langsdorffii coletadas em Lavras (Minas Gerais), as quais foram submetidas a uma escarificação em esmeril, no eixo oposto ao embrião (definido pela presença de uma saliência).

As sementes, escarificadas e não escarificadas foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar através da imersão em água destilada e autoclavada com detergente, por 10 minutos, seguidos de imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto e em hipoclorito de sódio (1,25% i.a) durante 15 minutos. Após a realização do processo de desinfestação, as sementes foram lavadas por seis vezes, em água destilada e autoclavada, para eliminação do excesso das soluções desinfetantes.

Em seguida, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), solidificado com 7,0 g L⁻¹ de ágar, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e com pH ajustado para 5,8, sendo o meio autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 2°C e irradiância de 35 μmol s⁻¹ m⁻², durante 20 dias, quando se avaliou o número de sementes germinadas.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 2, sendo duas procedências e o uso de sementes escarificadas e não escarificadas, em delineamento inteiramente casualizado, com 12 repetições, sendo cada repetição constituída por dois tubos, com uma semente por tubo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as comparações múltiplas de médias foram realizadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de (Gomes, 2000).

A análise de variância foi realizada utilizando o programa computacional SISVAR (Sistema para Análise de Variância), conforme Ferreira (2000).

5.2 Efeito da sacarose e giberelina na germinação *in vitro* de sementes

As sementes utilizadas foram provenientes de Lavras (MG), coletadas de plantas adultas localizadas no campus da UFLA.

Para a instalação dos experimentos, as sementes foram escarificadas em esmeril, no eixo oposto ao embrião, e posteriormente desinfestadas em câmara de fluxo laminar, através da imersão em água destilada e autoclavada com detergente, por 10 minutos, seguidos de imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto e em hipoclorito de sódio (1,25% i.a.) durante 15 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas por seis vezes, em água destilada e autoclavada.

As sementes desinfestadas foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura MS, pH ajustado em 5,8, solidificado com 7,0 g L⁻¹ de ágar e suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0; 10; 20; 30 e 40 g L⁻¹), em combinação com 0,0 e 2,0 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) sendo o meio autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 2°C e irradiância de 35 μmol s⁻¹ m⁻² durante 20 dias, quando se avaliou o período da germinação e o número de sementes germinadas.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 5 x 2, sendo cinco concentrações de sacarose em ausência e presença de GA₃, em delineamento inteiramente casualizado, com 12 repetições, sendo cada repetição constituída por dois tubos, com uma semente por tubo.

Os dados obtidos foram submetidos à interpretação estatística por meio da análise de variância. As comparações múltiplas de médias foram realizadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, e também a realizou-se a da análise de regressão (Gomes, 2000).

5.3 Estudo de algumas características anatômicas do tecido foliar de plantas de copaíba cultivada em diferentes ambientes

Para realização dos cortes transversais, foram coletadas cinco folhas completamente expandidas de plantas de copaíba com 16 meses de idade, mantidas no campo experimental do Departamento de Biologia da UFLA sob irradiância de $600 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura e irradiância de $43 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, durante 16 meses, e plantas cultivadas *in vitro*, mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, $27 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura e irradiância de $35 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, durante 40 dias, oriundas da germinação de sementes em meio MS na ausência de sacarose.

O material foi fixado em FAA 70% (Formaldeído + ácido acético + álcool etílico 70%) por 72 horas, seguindo a metodologia de Johansen (1940), e posteriormente conservado em álcool 70° GL. O estudo anatômico baseou-se no exame microscópico de seções obtidas a mão livre, na região mediana das folhas. Os cortes transversais foram clareados em solução com hipoclorito de sódio a 20% do produto comercial, por um período que variou de três a cinco minutos, em seguida lavados em água destilada, neutralizada em água acética 1%, e montados em glicerina a 50%. O corante usado foi a mistura de azul de astra-safranina, seguindo os métodos descritos por Kraus & Arduin (1997).

A partir das seções transversais foram efetuadas 4 medições de 5 plantas, com auxílio de ocular micrométrica, para as espessuras dos parênquimas esponjosos, paliçádico, das epidermes adaxiais e abaxiais.

As fotomicrografias foram obtidas utilizando um fotomicroscópio Olympus BX-60, existente no Laboratório de Citologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Os resultados obtidos das espessuras dos parênquimas esponjoso e paliádico e das epidermes adaxiais e abaxiais foram submetidos à análise de variância, sendo as comparações múltiplas de médias realizadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Gomes, 2000).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Germinação *in vitro* de sementes de copaíba

Através dos resultados obtidos, podemos observar que houve efeito significativo para a percentagem de germinação em sementes de copaíba em relação ao processo de escarificação, no entanto, para a procedência, não foram observadas diferenças estatísticas.

Na Tabela 1, observamos que a escarificação promoveu as maiores percentagens de germinação (75% AC e 89% MG), independentemente da procedência das sementes.

TABELA 1. Percentagem de germinação de sementes não escarificadas e escarificadas e provenientes de Rio Branco (AC) (*Copaifera multijuga*) e Minas Gerais (MG) (*Copaifera langsdorffii*), germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras – MG, 2001.

Procedência	Tratamento	
	Não escarificada	Escarificada
AC	33 aB	75 aA
MG	41 aB	89 aA

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Para Castro et al. (2002) a escarificação com lixa de sementes de paricá (*Schizolobium amazonicum*) promoveu 94% de germinação *in vitro*. Pinheiro et al. (2001) também obtiveram melhores taxas de germinação em sementes de mangaba (*Hancornia speciosa*) quando realizaram a escarificação das sementes (retirada do tegumento).

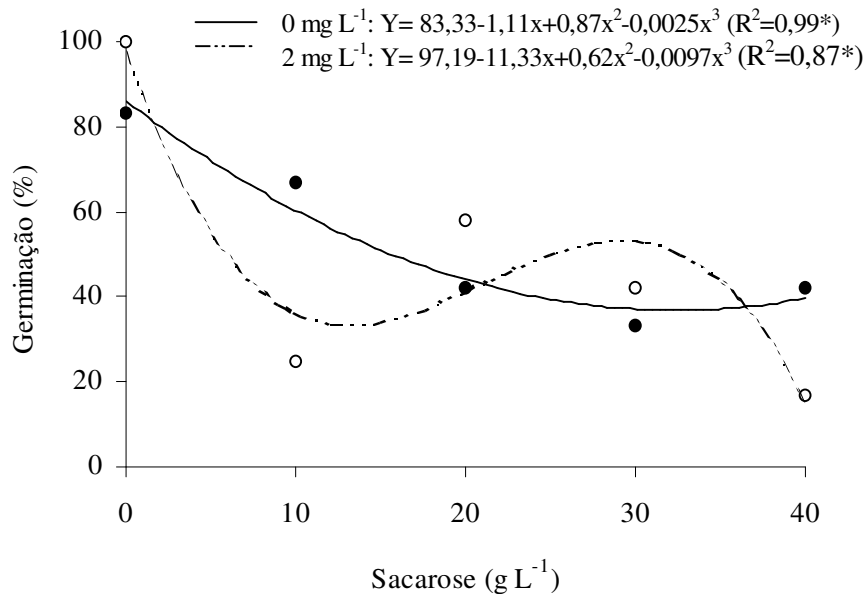
Segundo Castro et al. (2002) as sementes que sofrem escarificação apresentam melhores índices de germinação e desenvolvimento quando comparadas com outros métodos de superação de dormência comumente utilizados em laboratórios, como estratificação em baixa temperatura, imersão em solventes e utilização de giberelina ou citocinina.

6.2 Efeito da sacarose e giberelina na germinação *in vitro* de sementes

Não houve efeito significativo da adição de giberelina no meio de cultura na germinação das sementes de copaíba. No entanto, a concentração de sacarose apresentou efeito significativo.

A ausência de sacarose no meio de cultura promoveu os melhores percentuais de germinação, quando comparada às demais concentrações, sendo de 97% a germinação obtida com uso de 2,0 mg L⁻¹ de GA₃ e 83% a germinação obtida na ausência de GA₃ no meio de cultura (Figura 2).

A Figura 2 mostra que na ausência de giberelina o aumento na concentração de sacarose tende a diminuir a percentagem de germinação de sementes de copaíba, com mínimo de germinação (37%) sendo obtido com o uso de 32,1 g L⁻¹ de sacarose. Com a adição de 2,0 mg L⁻¹ de GA₃ no meio de cultura, verificamos uma tendência de queda de até 33% de germinação numa concentração de 13,3 g L⁻¹ de sacarose, a partir da qual há uma tendência de aumento, chegando a atingir 53,5% de germinação com 29,3 g L⁻¹ de sacarose.



0,

FIGURA 2. Germinação *in vitro* de sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) inoculadas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose na ausência e presença de 2,0 mg L⁻¹ de GA₃. UFLA, Lavras – MG, 2001.

Em estudos com sementes de mangaba (*Hancornia speciosa*) Pinheiro et al. (2001) observaram que concentrações de sacarose até 10 g L⁻¹ de sacarose proporcionaram as maiores taxas de germinação, e que concentrações acima desta faixa reduziram a percentagem de sementes germinadas.

Segundo George (1993), essa diminuição da germinação pode ser decorrente da regulação osmótica do meio de cultura, visto que a adição de sacarose tende a diminuir o potencial osmótico do meio de cultura, no caso da germinação de sementes, este fator tem relevância, pois a diminuição de água disponível para embebição das sementes, pode impossibilitar o início do processo de germinação.

Pinheiro et al. (2001) relatam que a germinação de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa*) é favorecida com adição de 0,1 mg L⁻¹ de GA₃. Em estudos com sementes de paricá, Castro et al. (2002) não obtiveram diferença estatística com o uso de GA₃ no meio de cultura para germinação *in vitro*, obtendo uma percentagem de germinação de 94%.

Os resultados obtidos encontram suporte em resultados semelhantes obtidos por Sabá et al. (2002), os quais não verificaram diferenças estatísticas para a germinação de sementes de Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) na presença ou ausência de GA₃. Entretanto, Deccetti (2000), estudando a germinação *in vitro* de sementes de *Annona glabra* armazenadas por 2 meses, verificou que o uso de 2,0 mg L⁻¹ GA₃ reduziu a germinação, principalmente em concentrações elevadas de sacarose.

É possível que o uso isolado de GA₃ não apresente efeito positivo sobre a germinação de sementes de copaíba, indicando que este processo fisiológico pode ser controlado por mais de uma substância promotora, além do GA₃. As sementes de copaíba provavelmente devem apresentar um nível endógeno de GA₃ suficiente para promover alta germinação.

A figura 3 mostra o aspecto geral de sementes de copaíba germinadas *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose, na ausência e presença de GA₃.

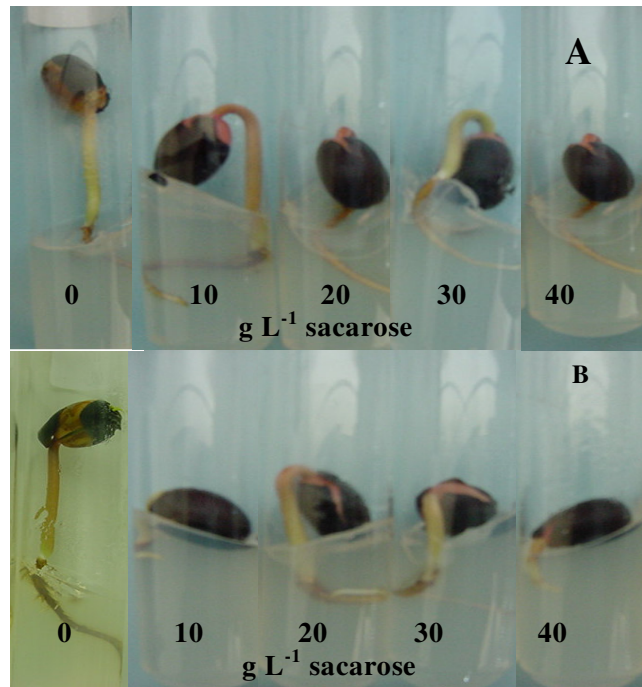


FIGURA 3. Sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) germinadas 15 dias após a inoculação em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose na ausência (A) e presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 (B). UFLA, Lavras – MG, 2001.

Segundo Fortes (1992) e Serret (1997) a vantagem de cultivar sementes *in vitro* na ausência ou em concentrações reduzidas de sacarose no meio de cultura favorece o desenvolvimento de mixotrofia, mecanismo de nutrição do carbono intermediário, entre as condições autotróficas (naturais) e heterotróficas (*in vitro*), já que a reduzida atividade fotossintética das plantas *in vitro* se deve, em grande parte à inibição da enzima Ribulose-1,5-Bifosfato Carboxilase-Oxigenase (Rubisco) pela sacarose presente no meio de cultura. Sendo assim, o desenvolvimento de plantas em condições mixotróficas aumentaria a atividade fotossintética das plantas, implicando em plantas mais bem desenvolvidas e posterior facilidade no processo de aclimatização.

6.3 Estudo de algumas características anatômicas do tecido foliar de plantas de copaíba cultivada em diferentes ambientes

Nas seções transversais da lâmina foliar (de plantas de copaíba em três ambientes de cultivo), observou-se a presença de uma epiderme adaxial e abaxial uniestratificada revestida pela cutícula. O mesofilo da espécie *Copaifera langsdorffii* possui uma organização dorsiventral (Figura 4).

A partir das seções transversais das folhas de plantas estabelecidas *in vitro*, observa-se que o mesofilo apresenta o parênquima paliçádico constituído de uma camada células com formato alongado e o parênquima esponjoso constituído de três a quatro camadas de células (Figura 4 A).

Já no mesofilo das plantas estabelecidas em sala de crescimento, observa-se que o parênquima paliçádico é constituído de uma camada de células e o parênquima esponjoso constitui-se de duas a três camadas (Figura 4 B).

Para o mesofilo das plantas estabelecidas no campo, observa-se que o parênquima paliçádico é constituído de uma camada de células alongadas e bem justapostas e o parênquima esponjoso apresenta de três a quatro camadas (Figura 4 C).

O que se observa em geral, para plantas de cultivo *in vitro*, é uma pouca diferenciação do mesofilo foliar, com alta proporção de espaços intercelulares em relação a plantas de cultivo normal em campo, o que pode contribuir para uma maior perda de água pelas plantas.

Outra característica importante é a presença de cutícula, sendo que essa característica ajuda a diminuir excessiva perda de água, que evita contribuir para dessecação das mudas após a transferência para o campo.

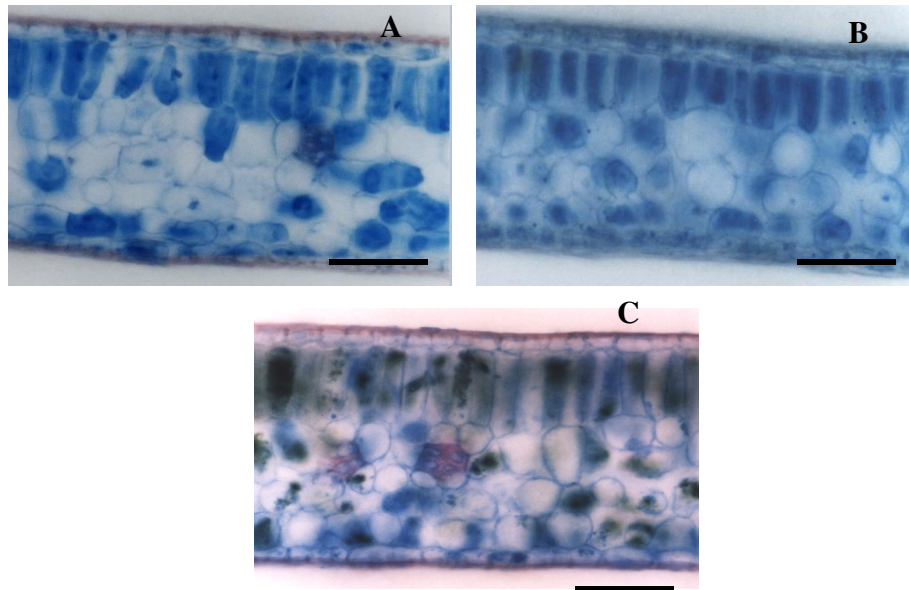


FIGURA 4. Seções transversais da lâmina foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) cultivada *in vitro* (A), em sala de crescimento (B) e campo (C). As barras nas figuras correspondem a 50 µm. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fidelis (1998) em estudos com plantas de mama-cadela (*Brosimum guadichaudii* Trec.) também verificou diferenças entre o cultivo *in vitro* e *in vivo*, sendo que o parênquima paliçádico e esponjoso *in vivo* eram constituídos de uma e duas camadas células, respectivamente, e *in vitro* o mesofilo apresentou três a quatro estratos de células, porém sem diferenciação no formato.

Em estudo de anatomia com plantas de café, Santos (2001) observou que o parênquima paliçádico era constituído por uma camada de células nas plantas *in vitro* e *in vivo*, enquanto o parênquima esponjoso apresentava diferença, sendo constituído por oito camadas de células nas plantas *in vivo* e cinco a seis camadas nas de cultivo *in vitro*.

Em espécies de diferentes estágios sucessionais, cultivadas sob diferentes níveis de radiação, as folhas foram mais espessas com aumento do mesofilo, quando submetidas a pleno sol (Zanela, 2001).

Fráguas (2003) observou pouca diferenciação celular *in vitro* do mesofilo foliar de figueira, que apresentou uma camada de célula no parênquima paliçádico e duas camadas no parênquima esponjoso, e alta proporção de espaços intercelular, para plantas cultivadas em campo, o parênquima paliçádico apresentou-se com duas camadas de células e o parênquima esponjoso, com cinco a seis camadas, além da presença de cutícula bastante espessa.

Em relação à espécie *Copaifera langsdorffii*, observou-se que diferenças significativas ocorreram na espessura da epiderme da face adaxial, parênquimas paliçádico e esponjoso e epiderme abaxial, como pode ser observado na Tabela 2.

TABELA 2. Espessura média (μm) da epiderme adaxial (EAD), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), epiderme abaxial (EAB) e limbo (LB) foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em diferentes ambientes de cultivo. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Ambiente de cultivo	EAD	PP	PE	EAB	LB
<i>In vitro</i>	8,94 b	32,96 b	65,50 b	8,05 a	115,45 b
Sala de crescimento	8,57 c	20,19 c	58,48 c	7,71 b	94,68 c
Campo	9,86 a	41,47 a	71,71 a	8,37 a	131,40 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

As espessuras das epidermes adaxial e abaxial foram influenciadas pelos ambientes de cultivo, com a condição de campo superior as demais apresentadas, sendo as plantas cultivadas em sala de crescimento as que apresentaram menores espessuras da epiderme abaxial.

As plantas cultivadas no campo apresentaram os parênquimas paliçádico e esponjoso mais espessos, sendo as do cultivo em sala de crescimento as que apresentaram menor espessura.

Em relação ao parênquima paliçadico, é relatado que a adição ou alongamento de células é proporcionado pelo aumento do nível de luz e está relacionada à redução na resistência do mesofilo ao dióxido de carbono (Nobel, 1977).

A importância do parênquima esponjoso está relacionada com o aumento na eficiência fotossintética, implicando em facilitação na realização das trocas gasosas nas folhas.

Santos (2001) observou, em seções transversais da lâmina foliar de plantas de café, que os parênquimas paliçadico e esponjoso apresentaram-se mais espessos no cultivo *in vitro*.

Em plantas de figueira, foi observado que os tecidos foliares de plantas aclimatizadas encontravam-se mais desenvolvidos em relação às plantas *in vitro* (Fráguas, 2003).

Através das seções transversais realizadas no limbo foliar das plantas de copaíba cultivadas em diferentes ambientes, observou-se a ocorrência de canais secretores (Figura 5).

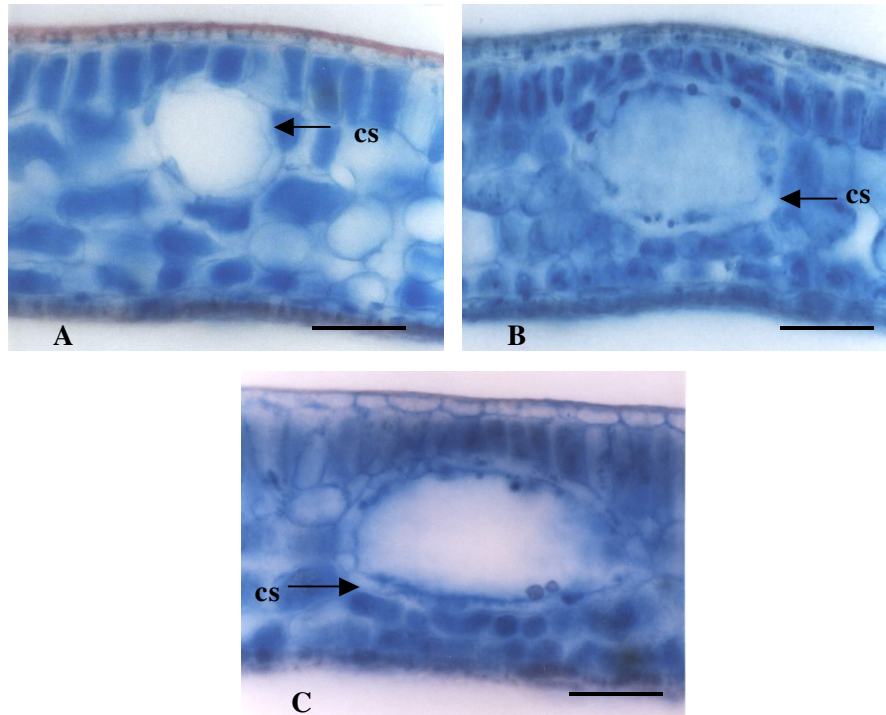


FIGURA 5. Seções transversais da lâmina foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) cultivada *in vitro* (A), em sala de crescimento (B) e campo (C), evidenciando as células secretoras (cs). As barras nas figuras correspondem a 50 μ m. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Record & Hess (1943) relatam que estes canais que ocorrem em todas as espécies do gênero *Copaifera* produzem goma ou óleo conhecido no comércio como óleo de copaíba, sendo usado como ingrediente medicinal, verniz em trabalhos artesanais e também pelos índios para passar sobre seus corpos e cabelos com propósitos medicinais.

Marcati et al. (2001) em estudos de anatomia do lenho em *Copaifera langsdorffii*, verificaram a existência de canais axiais em toda a faixa marginal do lenho, e que os mesmos se originam a partir do afastamento de células parenquimáticas.

Na região mediana da nervura central são observadas diferenças no sistema vascular das plantas em diferentes ambientes de cultivo. Em condições *in vitro* (Figura 6A), observou-se um número bem menor de células nos vasos do xilema, sendo que nas condições de sala de crescimento (Figura 6B) houve um aumento na quantidade e diâmetro dos feixes vasculares; e para a condição de campo (Figura 6C), a quantidade e o diâmetro dos feixes vasculares, apresentaram-se em maior número que os demais ambientes.

Nota-se ainda a existência de fibras pericíclicas para ambos os ambientes de cultivo, porém sendo observadas essas fibras pericíclicas com maior intensidade em plantas cultivadas em campo.

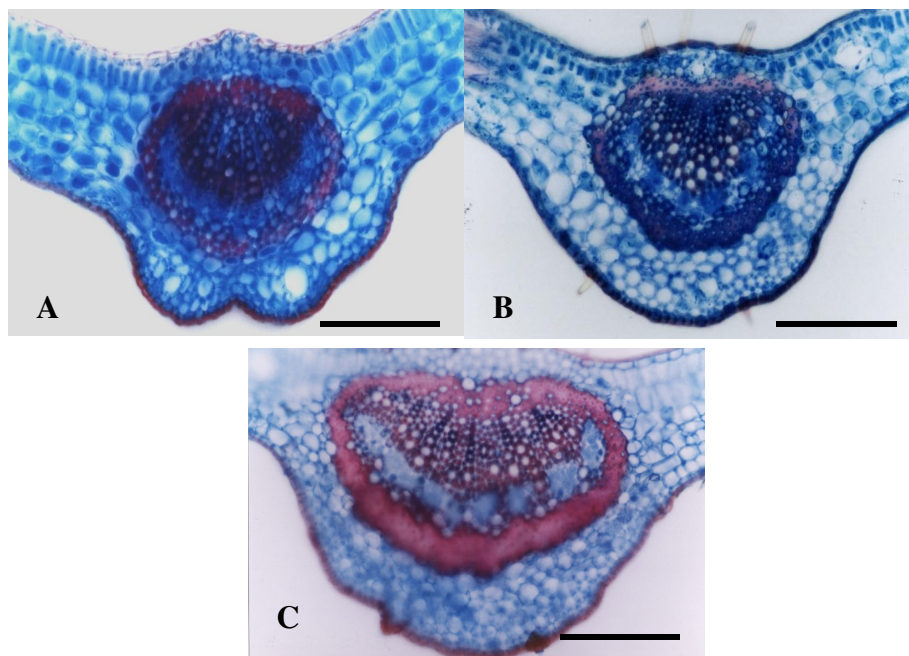


FIGURA 6. Seções transversais da nervura principal de folhas de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), oriundas de planta cultivada *in vitro* (A), em sala de crescimento (B) e campo (C). As barras nas figuras correspondem a 50 μ m. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Zanela (2001) em estudos com espécies de diferentes estágios sucessionais cultivadas sob diferentes níveis de radiação, obteve sistema vascular mais denso e paredes celulares mais espessas em espécies submetidas a pleno sol.

7 CONCLUSÕES

Sementes escarificadas de copaíba apresentam maiores percentuais de germinação *in vitro*.

A ausência de sacarose no meio de cultura proporciona maiores percentagens de germinação *in vitro* em sementes de copaíba.

O uso de giberelinas no meio de cultura não influencia a germinação de sementes de copaíba.

Plantas estabelecidas *in vitro* apresentaram diferenciação celular dos tecidos, indicando, possivelmente, melhores respostas na fase de aclimatização.

É verificada a presença de canais secretores nas seções transversais do limbo foliar de plantas de copaíba para os diferentes ambientes de cultivo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, I.B.; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLA.M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRANTES, 1993. 350p.

BORGES, E.E.L. et al. Comparação de métodos de quebra de dormência em sementes de copaíba. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v.4, n.1, 1982.

CARVALHO, G.R. **Germinação de sementes e aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro***. 1997. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CASTRO, I.M. et al. Germinação *in vitro* de paricá (*Schizobium amazonicum* Huber): Obtenção de plântulas assépticas para iniciar a micropropagação. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 27, p. 58-61, jul./ago. 2002.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant. Gembloux, **Parasítica**, v.40, p.69-75, 1984.

DECCETTI, S.F.C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S.K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.28, n.4, p.331-337, May 1986.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DA BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos**. São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FIDELIS, I. **Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Mama-cadela) uma espécie considerada medicinal**. 1998. 109p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FORTES, G.R.L. **Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus spp.*) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos**. 1992. 163p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FRÁGUAS, C.B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes**. 2003. 110p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: parte 1 – the technology**. 2.ed. Edington: Exergetics, 1993. 574p.

- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel, 2000. 466p.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill, 1940.
- JUNIOR GMITTER, F.G.; MOORE, G.A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination and plant survival. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.6, p.139-147, 1986.
- KAUFMANN, M.R.; TROENDLE, C.A. The relationship of leaf area and foliage biomass to sapwood conducting area in four subalpine forest tree species. **Forest Science**, Bethesda, v.27, p.477-482, 1981.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198p.
- MACHADO, J.W.B.; ALENCAR, F.O.C.C.; RODRIGUES, M.G.P. **Árvores de Brasília**. Brasília: GDF, 1992. 100p.
- MARCATI, C.R.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V.; BENETATI, L. Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf.(Leguminosae-Caesalpinoideae) de floresta e cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.3, p.311-320, set. 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** v.1, n.15, p.473-497, 1962.
- NOBEL, P.S. International leaf area and cellular CO₂ resistance: photosynthetic implications of variations with growth conditions and plant species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.40, p.137-144, 1977.
- PATTON, L.; JONES, M.B. Some relationships between leaf anatomy and photosynthetic characteristics of willows. **New Phytologist**, Cambridge, v.111, n.4, p.657-661, Apr. 1989.
- PINHEIRO, C.S.R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília. AGIPLAN, 1985. p.39-93.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001. p.533-547.

RECORD, S.J.; HESS, R.W. **Timbers of the new world**. New Haven: Yale University, 1943. 183p.

SABA, R.T. et al. Micropropagação do Jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.1, p. 106-109, 2002.

SANTOS, C.G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SERRET, M.D. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimatization *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, n.3, p.217-230, 1997.

SHORT, K.C. et al. *In vivo* physiology and acclimatization of aseptically cultured plantlets. In: NAVAK, F.J.; HAVEL, T.; DOLEZEL, K. (Ed.). **Proceeding International Society Plant Tissue Culture Application for Crop Improvement**. Olomouc: Czechoslovakia, 1985. p.475-486.

SMITH, W.K.; VOGELMAN, T.C.; DELUCIA, E.H. Leaf form and photosynthesis. **Bio-Science**, Arlington, v.47, p.785-793, 1997.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S.M.C.; FURTADO, J.S. Anatomical changes in the hard endosperm of gibberelic acid treated coffee seeds during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.2, n.1, p.103-106, 1979.

ZANELA, S.M. **Respostas ecofisiológicas e anatômicas ao sombreamento ecológico em plantas jovens de diferentes grupos**. 2001. 79p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

ZIV, M.A. The relationship between cell wall deformity and stomatal malfunction in the leaves of carnation *in vivo*. **Proceeding International Society Plant Molecular Biology**, Jerusalém, p. 425, 1988.

ZIV, M.A. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation – technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 45-79.

CAPÍTULO III
INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DE
COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii* Desf.)

1 RESUMO

AZEVEDO, Kelceane de Souza. Indução de brotações em segmentos nodais de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). In: _____. **Indução e análises bioquímicas de calos e anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. Cap. 3, p.42-55. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A busca por alternativas de propagação, principalmente para as plantas medicinais, tem se intensificado ao longo dos anos com destaque para as técnicas de propagação *in vitro*. Objetivou-se neste trabalho a indução *in vitro* de brotações axilares em segmentos nodais de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). Segmentos nodais contendo uma gema axilar foram inoculados em meio MS e WPM suplementados com diferentes concentrações de BAP. Os resultados indicaram diferenças significativas para tamanho e peso de biomassa seca de brotações em relação ao meio de cultura utilizado e concentrações de BAP. O meio MS foi superior ao WPM tanto para promover maior crescimento das brotações quanto ao peso de biomassa seca. Maior comprimento de brotação e maior peso de biomassa seca foi obtido inoculando-se segmentos nodais em meio MS acrescido de 0,86 e 0,83 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente.

* Comitê Orientador: Renato Paiva (Orientador) – UFLA, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-orientadora) – UFLA, Moacir Pasqual (Co-orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

AZEVEDO, Kelceane de Souza. Shoot induction in nodal segments of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). In: _____. **Induction and biochemical analysis of callus and aspects of leaf anatomy of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf)**. 2003. Cap. 2, p.42-55. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science)– Federal University of Lavras, Lavras.*

The search for alternative methods for medicinal plant propagation has increased during the past years with emphasis given to *in vitro* techniques. The objective of this work was to *in vitro* induce the development of axillary shoots in nodal segments of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). Nodal segments containing one axillary bud were inoculated in MS and WPM media supplemented with different concentrations of BAP. The results indicated significant differences for size and shoot dry matter weight according to the medium and BAP used concentrations. Compared to the WPM, the MS medium was superior to promote higher shoot growth and dry matter weight. Higher shoot length and higher dry matter weigh was obtained inoculating nodal segments in MS medium supplemented with 0.86 and 0.83 mg L⁻¹ BAP, respectively.

*Guidance Committee: Renato Paiva (Adviser) – UFLA, Patrícia Duarte Oliveira Paiva (Co-adviser) – UFLA, Moacir Pasqual (Co-adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A copaíba é uma espécie florestal bastante conhecida, principalmente na Amazônia; o óleo-resina produzido por esta planta possui propriedades medicinais reconhecidas na medicina popular, fato que vem despertando grande interesse pela espécie e que apresenta ainda uma ampla utilização na fabricação de produtos comésticos, além de ser matéria-prima para vernizes, tintas e fixadores de perfumes (Sebrae, 1995).

Embora a espécie seja propagada por sementes, nos últimos anos tem sido observado um aumento na procura de alternativas de propagação de plantas lenhosas, principalmente de plantas medicinais, em função da crescente utilização de fitoterápicos pela medicinal popular.

Dentre as técnicas alternativas de propagação mais utilizadas atualmente, destaca-se a micropropagação. Seu uso vem sendo difundido nos últimos anos por apresentar sucesso na propagação de espécies lenhosas, muitas das quais em vias de extinção ou que apresentam qualquer dificuldade de propagação sexuada.

A micropropagação através da proliferação de gemas vem sendo bastante utilizada principalmente devido à formação de vários brotos, os quais são divididos, dando origem a novos explantes.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Atualmente a atividade comercial de micropropagação concentra-se principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas. Sendo assim, os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro* são ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados,

devido aos mesmos possuírem determinação para o crescimento vegetativo. Sendo satisfeitas as necessidades nutricionais, esses explantes podem desenvolver naturalmente em plantas através da totipotencialidade (Grattapaglia & Machado, 1998).

O sucesso da cultura de tecidos como alternativa de propagação é influenciado pela natureza do meio de cultura. Murashige & Skoog (1962) determinaram a concentração de sais em um meio para micropropagação de fumo, estabelecendo nesta época o meio 'MS'. Lloyd & McCown (1980), no entanto, desenvolveram um meio de cultura para brotações de plantas lenhosas contendo quantidades inferiores de sais em relação ao meio MS, denominado WPM (Woody Plant Medium).

Dentre os reguladores de crescimento utilizados em cultura de tecidos, as citocininas constituem a classe com maior utilização na fase de multiplicação, devido ao seu efeito na quebra da dominância apical e na indução da proliferação de gemas axilares. O BAP (Benzilaminopurina) tem sido a citocinina mais utilizada devido à sua eficiência na multiplicação da parte aérea e a indução de gemas adventícias em várias espécies lenhosas, em concentrações variáveis, em geral entre 0,1 a 5,0 mg L⁻¹ (Pasqual et al., 2001).

Pinto et al. (1994) estudaram a multiplicação *in vitro* de pau-santo (*Kilmeyera coriacea*) utilizando segmentos nodais e apicais inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP. Esses autores obtiveram maior número de brotações (7,3 por segmento) utilizando 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Concluíram, ainda, que a espécie é sensível a altas concentrações de BAP, não sendo essas eficazes para o crescimento e desenvolvimento dos explantes.

Em plantas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) Pereira et al. (1995) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de BAP, ou em combinação com AIA em meio MS, e observaram que o meio suplementado com 3,0 mg L⁻¹ de

BAP proporcionou o maior número de brotações formadas. A adição de AIA não promoveu efeito sobre o número de brotações formadas, mas aumentou o comprimento, principalmente na concentração de 0,4 mg L⁻¹ de BAP.

Estudos com a propagação *in vitro* da espécie medicinal *Eucommia ulmoides* concluíram que o meio MS foi mais adequado que o WPM para o estabelecimento inicial da cultura, assim como a subsequente multiplicação de brotações, obtendo uma taxa de 7,5 novos brotações/explante (Chen et al., 1995).

Já Coelho (1999), utilizando segmentos nodais para propagação *in vitro* de sucupira-branca (*Pterodon pubescens*) em meio MS e WPM, verificou que o melhor desenvolvimento dos segmentos ocorreu em meio WPM. No mesmo estudo, foi verificado que a adição de 3,0 mg L⁻¹ de BAP proporcionou a maior quantidade de brotações por segmento nodal.

Em plantas de marmelinho (*Tournefortia cf paniculata*) micropropagadas através de segmentos nodais provenientes de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*, Bertolucci (2000) observou a superioridade do meio WPM em relação ao meio MS, com maior número de brotações sendo obtido quando suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

Ao estudar um protocolo para micropropagação de chá-de-bugre (*Rudgea viburnoide*), Bonilla (2002) observou que segmentos nodais contendo duas gemas axilares produziram maior número de brotações quando inoculados em meio WPM na presença de 4,0 mg L⁻¹ de BAP.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos meios de cultura MS e WPM e da citocinina BAP na indução de brotações em segmentos nodais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*).

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

5.1 Coleta e assepsia dos explantes

Os explantes foram constituídos por segmentos nodais de aproximadamente 1,0 cm de comprimento, contendo uma gema axilar, retirados de mudas obtidas através da germinação *in vivo* de sementes provenientes de plantas adultas cultivadas em Lavras (MG).

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em água destilada e autoclavada com detergente por 10 minutos, seguidos de imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto e em seguida deixados em uma solução de hipoclorito de sódio (1,25% i.a.) durante 15 minutos. Ao final do processo de desinfestação, os explantes foram lavados em água destilada e autoclavada por cinco vezes.

5.2 Inoculação dos explantes

Os explantes nodais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) ou WPM (Lloyd & Mccown, 1980), suplementados com 7,0 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose e as seguintes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento a 27 ± 2°C, com 16 horas de fotoperíodo e irradiância de 35 µmol m⁻² s⁻¹, por um período de 60 dias, quando avaliou-se o tamanho das brotações (cm) formadas e a biomassa seca das brotações (g). Para determinação da biomassa seca, as brotações obtidas *in vitro* foram mantidas em estufa a 60°C durante 10 dias.

5.3 Análises Estatísticas

O experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por quatro tubos de ensaio, contendo um explante por tubo. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 5 x 2, sendo cinco concentrações de BAP e dois meios de cultura.

Os dados obtidos foram submetidos à interpretação estatística por meio da análise de variância, e as comparações múltiplas de médias foram realizadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A análise de regressão e o ajustamento das curvas de regressão foram realizados segundo Gomes (2000).

Todas as análises de variância foram realizadas no programa SISVAR (Ferreira, 2000).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Tamanho de brotações

Não foi observada a formação de mais de uma brotação nos segmentos nodais, assim como também não houve formação de raízes ou calos na base dos segmentos nodais.

Para o tamanho de brotações, observa-se que o meio de cultura MS foi superior ao WPM.

Para o tamanho de brotações cultivadas em meio MS, verificou-se que o maior tamanho de brotação (3,25 cm) pode ser obtido com o uso 0,86 mg L⁻¹ de BAP, a partir do qual há uma tendência de redução no tamanho das brotações. Observa-se ainda que a ausência de BAP no meio de cultura também proporcionou menor crescimento das brotações (Figura 7).

Para o efeito das concentrações de BAP no meio de cultura WPM, observa-se que o tamanho das brotações tende a aumentar até a concentração de 1,18 mg L⁻¹ de BAP, proporcionando o maior tamanho de brotação (2,33 cm). Observou-se ainda uma tendência de queda no comprimento das brotações em concentrações acima de 1,18 mg L⁻¹ (Figura 7).

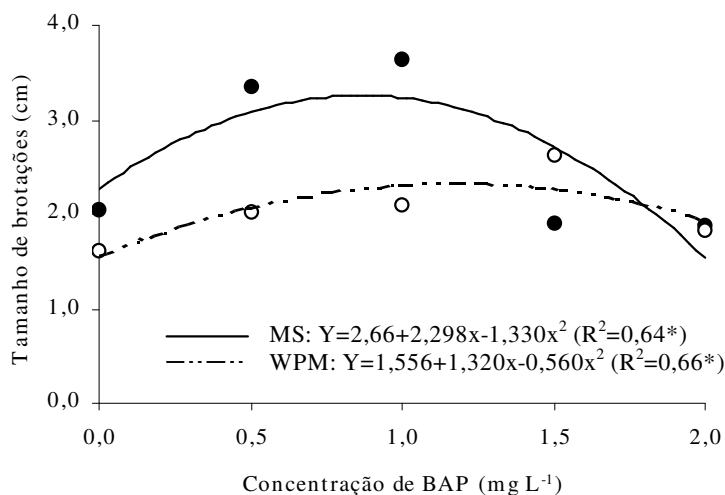


FIGURA 7. Efeito da concentração de BAP sobre o tamanho de brotações (cm) formadas em segmentos nodais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em meio MS e WPM. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Observa-se que, tanto para o meio MS quanto WPM, os maiores tamanhos de brotações ocorreram entre 0,8 e 1,2 mg L⁻¹ de BAP, e em concentrações superiores verificou-se uma tendência de queda no comprimento da parte aérea independente do meio de cultivo.

Esses resultados concordam com os dados obtidos por Chen et al., (1995) para a espécie *Eucommia ulmoides*, em que 1,0 mg L⁻¹ de BAP adicionado ao meio MS foi superior ao WPM na cultura de brotos apicais, além da obtenção de brotos mais verdes e vigorosos. Decetti (2000) também

verificou que concentrações inferiores a $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP em meio MS favorecem a obtenção de brotações mais alongadas em *Annona glabra*.

Por outro lado, esses resultados diferem dos obtidos por Bonilla (2002) em plantas de chá-de-bugre, que comparou os meios MS e WPM, adicionados a diferentes concentrações de BAP, concluindo que o WPM foi superior na obtenção de maiores brotações.

Chebel et al. (1998) obtiveram maiores comprimentos de brotações de peperina (*Minthostachys mollis*) na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP. Resultados semelhantes aos obtidos por Ault (2002), em que $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP induziu maiores tamanho de brotações em plantas de *Hymenoxys acaulis*.

Resultados diferentes foram obtidos por Andrade et al. (2000) em que o maior crescimento de brotações de aroeira (*Myracrodruon urudeuva*) foi verificado na concentração de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

Para a espécie chá-de-bugre, Bonilla (2002) obteve maior tamanho de brotação (3,95 cm) em meio WPM, suplementado com $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, concentração quatro vezes maior do que a observada nos experimentos com copaíba.

De acordo com Yui et al. (1993) a utilização de concentrações elevadas de BAP promove a formação de grande número de brotos em detrimento, porém, de seu desenvolvimento. Grattapaglia & Machado (1998) relatam que a tendência de diminuição do comprimento da brotação a partir de determinada concentração pode estar ligada ao fato de que as citocininas estimulam a maior produção de parte aérea até uma determinada concentração, o que é específico para cada espécie; a partir dessa concentração ocorre um efeito tóxico.

Com base nesse contexto, e a partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que a copaíba é uma espécie que necessita de concentrações relativamente baixas de BAP para a obtenção de brotações com maiores

comprimentos, portanto não respondem bem a altas concentrações dessa citocinina.

6.2 Biomassa seca de brotações

Observa-se que para a biomassa seca de brotações, a presença de BAP induziu maior acúmulo de matéria seca quando os explantes foram inoculados em meio MS. Para o meio WPM, não foram verificadas diferenças significativas para as concentrações de BAP utilizada.

As concentrações de BAP para o meio MS proporcionaram um ajuste quadrático para a biomassa seca de brotações, com o máximo valor (0,048 g) obtido com 0,83 mg L⁻¹ de BAP, sendo que a partir desta concentração há uma tendência de queda no crescimento das brotações (Figura 8).

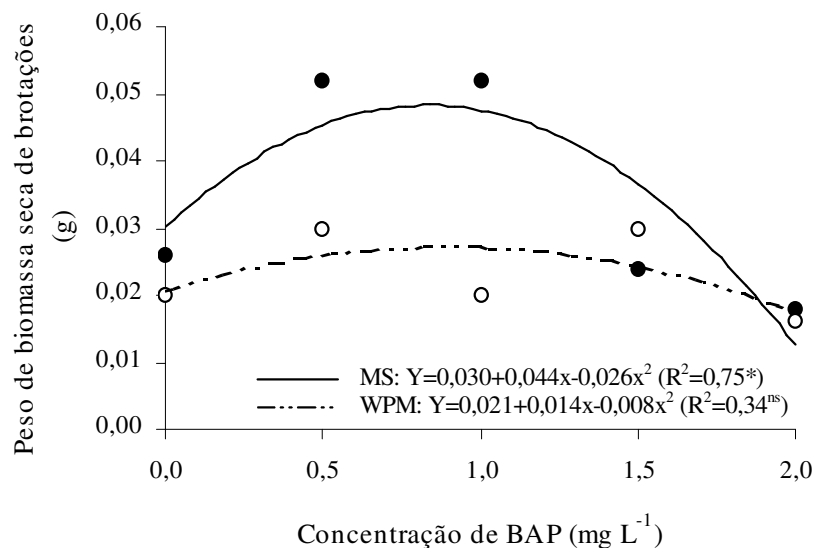


FIGURA 8. Efeito de níveis crescentes de BAP sobre a biomassa seca de brotações formadas em segmentos nodais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) inoculados em meio MS e WPM. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Os resultados referentes à biomassa seca de brotações obtidos neste trabalho diferem dos verificados por Conceição (2000) em plantas de timbó, em que se verificou que a presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP proporcionou um aumento significativo na matéria seca das brotações.

E para a espécie marmelinho (*Tournefortia cf paniculata*) não foram observadas diferenças na biomassa seca de brotações ao se compararem os meios MS, MS 50% e WPM (Bertolucci, 2000).

Porém, estes resultados diferem dos obtidos por Bonilla (2002) em chá-de-bugre, onde o meio WPM proporcionou maior biomassa seca de brotações e que houve uma tendência de aumento no tamanho das brotações nas concentrações de $0,0$ a $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no meio MS.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), os efeitos tóxicos causados pelo uso em excesso de citocininas caracterizam-se principalmente pelo demasiado surgimento de brotações e falta de alongamento, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos internós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento.

Sudha et al. (1998) observaram efeitos negativos como aspecto hiperhídrico, caules engrossados, clorose e até necrose para concentrações entre $3,0$ e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP para a espécie *Holostemma annulare*.

Em plantas de copaíba, observa-se que concentrações acima de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP causam uma redução no crescimento das brotações sem, no entanto serem verificados os efeitos característicos de toxicidade.

7 CONCLUSÕES

O meio MS foi superior ao WPM para promover maior comprimento e biomassa seca de brotações formadas em segmentos nodais de copaíba.

O maior comprimento de brotação é obtido inoculando-se segmentos nodais em meio MS suplementado com 0,86 mg L⁻¹ de BAP.

Maior peso de biomassa seca é obtido na presença de 0,83 mg L⁻¹ de BAP.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p. 174-180, 2000.

AULT, J.R. Micropropagation of the Rare Lakeside Daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). **HortScience**, v.37, n.1, p. 200-201, 2002.

BERTOLUCCI, S.K.V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* (Cham).** 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BONILLA, M.G.O. **Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.** 2002. 162p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CONCEIÇÃO, H.E.O. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris sp.*)** 2000. 191p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHEBEL, A.V. et al. Micropropagation of *Minthostachys mollis* (H.B.K) Griseb. and essential oil composition of clonally propagated plants. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, Columbia, v.34, p. 249-251, 1998.

CHEN, L.J.; HU, T.W.; HUANG, L.C. A protocol toward multiplication of the medicinal tree, *Eucommia ulmoides* Oliver. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, Columbia, v.31, p. 193-198, 1995.

COELHO, M.C.F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de Sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth)]**. 1999. 119p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DECETTI, S.F.C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DA BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos-SP. **Resumos**. São Carlos-SP: UFSCar, 2000. p.255-258.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel, 2000. 466p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. ***International Plant Propagators Society Proceedings***, v.30, p. 421-427, 1980.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Copenhagen, ***Physiologia Plantarum***, v.15, n.3, p. 437-497, 1962.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p. 66-69.

PEREIRA, A.M.S. et al. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.42, p. 295-297, 1995.

PINTO, J.E.B.P. et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p. 867-873, 1994.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS DO ACRE.
Copaíba: opções de investimento no Acre com produtos florestais não madeireiros. Rio Branco, 1995.

SUDHA, C.G.; KRISHNAN, P.N.; PUSHPANGADAN, P. *In vitro* propagation of *Holostemma annulare* (roxb.) K. Schum., a rare medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Columbia, v.33, p. 57-63, 1998.

YUI, E. et al. Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira M-7. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.5, p. 597-602, 1993.

CAPÍTULO IV

INDUÇÃO DE CALOGÊNESE E ANÁLISES BIOQUÍMICAS DOS CALOS FORMADOS EM EXPLANTES FOLIARES DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii* Desf.)

1 RESUMO

AZEVEDO, Kelceane de Souza. Indução de calogênese e análises bioquímicas dos calos formados em explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). In: _____. **Indução e análises bioquímicas de calos e anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. Cap. 4, p.56-82. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Em cultura de tecidos a propagação de plantas via formação de calos é um método potencial, principalmente em plantas que apresentam dificuldades de propagação sexuada. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi promover a indução *in vitro* e analisar bioquimicamente o crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). Para a indução de calos, segmentos foliares foram inoculados em meio MS acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. O uso de 1,0 mg L⁻¹ de BAP em combinação com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, proporcionou a maior formação de calos. O crescimento dos calos apresentou um padrão sigmóide com cinco fases de crescimento: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. A repicagem dos calos deve ser realizada entre 126 e 154 dias após a inoculação. Os maiores teores de proteína total e aminoácidos foram observados até o 56º dia de inoculação, período coincidente com a fase lag de crescimento. Os maiores teores de açúcares solúveis totais foram observados no 84º dia de cultivo,

*Comitê Orientador: Renato Paiva (Orientador) – UFLA, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-orientadora) – UFLA, Moacir Pasqual (Co-orientador) - UFLA.

correspondendo às fases lag e exponencial. Para açúcares redutores, o dia de inoculação apresentou-se com os maiores teores.

2 ABSTRACT

AZEVEDO, Kelceane de Souza. Induction and biochemical analysis of callus formed in leaf explants of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). In: _____. **Induction and biochemical analysis of callus and aspects of leaf anatomy of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf)**. 2003. Cap. 4, p.56-82. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science)– Federal University of Lavras, Lavras*.

Plant propagation from callus culture is considered a potential method for plants that present difficulties to propagate from seeds. The objective of this work was to promote the *in vitro* induction and to biochemically analyze callus from leaf segments of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). For callus induction, leaf segments were inoculated in MS medium supplemented with different concentrations of BAP and 2,4-D. The combination of 1.0 mg L⁻¹ BAP and 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D induced higher callus formation. Callus growth presented a sigmoid shape with five growth phases: lag, exponential, linear, deceleration and stationary. The medium replacement during culture has to be performed between 126 and 154 days after explant inoculation. Higher levels of total proteins and amino acids were observed 56 days after inoculation, period which coincided with the lag growth phase. Higher levels of soluble sugars were observed 84 days after inoculation corresponding to the lag and exponential phases. For reducing sugars, higher levels were observed at the inoculation day.

*Guidance Committee: Renato Paiva (Adviser) – UFLA, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (Co-adviser) – UFLA, Moacir Pasqual (Co-adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

No Brasil, a copaíba é uma espécie florestal de importância sócio-econômico reconhecida devido, principalmente, a seus atributos medicinais. É uma espécie potencial para manejo em áreas de floresta, o que torna necessários estudos sobre formas alternativas de propagação para a sua utilização racional.

A propagação por meio da cultura de tecidos pode ser feita por via direta ou indireta (via formação de calo), podendo esta última ser considerada como método potencial de propagação, caso as variações genéticas (mutações) não atinjam valores percentuais elevados (Pierik, 1987). A tecnologia da cultura *in vitro*, através da calogênese tem mostrado contribuições significativas para o avanço do processo de propagação de plantas lenhosas.

Por ser uma técnica que possibilita resultados bastante práticos, a cultura de tecidos necessita de mais informações básicas para seu melhor entendimento. Sendo assim, estudos bioquímicos que caracterizem as possíveis mudanças que ocorrem no explante poderão fornecer dados importantes relacionados ao processo de estabelecimento *in vitro* de espécies vegetais.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

O calo é uma resposta comum quando um tecido cultivado *in vitro* passa por injúrias físicas ou químicas, podendo se diferenciar em órgãos ou tecidos. Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante; entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em ápices caulinares, gemas axilares e regiões meristemáticas, são mais adequados (Handro & Floh, 1990).

Diversas características inerentes aos explantes interferem na calogênese, como o tamanho do explante, a composição do meio de cultura, os reguladores de crescimento e a idade da planta mãe. A frequência de sobrevivência e a velocidade de desenvolvimento dos calos estão diretamente relacionadas com o seu tamanho inicial (Murashige, 1974).

Em culturas de calos pode ocorrer a variação somaclonal, ou seja, a variação genética do material *in vitro*, a qual segundo Pierik (1990) é devida principalmente ao tempo de duração da cultura e a desordens fisiológicas. Tais mutações tornam-se importantes do ponto de vista ecológico, pois garantem a biodiversidade dos sistemas.

Para que a cultura de calos obtenha sucesso, quase sempre é necessária a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, para suprir possíveis deficiências dos teores de fitohormônio nos explantes. Geralmente concentrações semelhantes de auxina e citocinina no meio de cultura promovem a formação de calos, mas este efeito varia em função do balanço hormonal endógeno de cada espécie (Pierik, 1987).

O desenvolvimento dos calos partindo de um fragmento de tecido pode ser dividido em três estágios: indução, divisão e diferenciação. Na fase de indução, durante a qual as células preparam-se para se dividir, o metabolismo é ativado e as células permanecem com tamanho constante. Durante esta fase ocorre síntese de proteína e DNA. Durante a divisão celular, ocorre a desdiferenciação das células para características parenquimáticas, resultando na formação de um crescimento padrão (Aitchison et al., 1977).

O crescimento e o desenvolvimento dos calos podem ser verificados através da curva de crescimento, a qual pode apresentar cinco fases distintas: fase lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (George, 1993). Parâmetros como o peso da matéria fresca da célula, número de células, proteína

total, atividades metabólicas e concentrações de nutrientes nos meios de cultura podem ser usados para avaliar a crescimento do calo.

A fase lag caracteriza-se como a fase de maior produção de energia e é correspondente ao período em que as células se preparam para a divisão, visando sua expansão. Caracteriza-se também pelo número estacionário de células, pelo início da imobilização de metabólitos sem qualquer divisão celular e pela síntese de proteínas e de compostos específicos.

A fase exponencial é a fase biossintética em que se observam as maiores taxas de divisão celular e aumento no número de células. A terceira fase, a linear, caracteriza-se pela diminuição da divisão celular. Na fase de desaceleração, a divisão celular diminui e ocorre a expansão da célula, devido à redução ou ao esgotamento dos nutrientes no meio de cultura, à presença de produtos tóxicos, à secagem do ágar e à diminuição do oxigênio no interior das células.

Na fase estacionária não é observada a ocorrência de divisão celular, não há síntese de biomassa e nem aumento no número de células. É a fase em que ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários nas células (Shimizu et al., 1977; Smith, 1992; Scragg & Allan, 1993; Santos, 2001; Bonilla, 2002).

A determinação da curva de crescimento de calos e o conhecimento de suas diversas fases servem como base para estudos em plantas medicinais, principalmente quando se deseja a produção de metabólitos secundários *in vitro*.

Alguns autores já estabeleceram curvas de crescimento para espécies vegetais como erva-baleira (*Cordia verbenácea*) (Lameira, 1997), lechieira (*Litchi chinensis*) (Mesquita, 1999), castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) (Serra et al., 2000), cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) (Santos, 2001) e chá-de-bugre (*Rudgea virbunoides*) (Bonilla, 2002).

Associados a curva de crescimento tem sido realizado estudos bioquímicos que caracterizam possíveis mudanças ocorridas nos calos.

As principais substâncias presentes nos tecidos vegetais são proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis, açúcares redutores, amido, lipídeos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos e pigmentos. Os métodos de identificação dessas substâncias são baseados em reações químicas específicas com reagentes, as quais podem ser quantificadas através de métodos colorimétricos.

As proteínas estão entre as mais abundantes moléculas orgânicas e desempenham várias funções, dentre elas: estrutural, enzimática, armazenamento, transporte e anticorpos (Raven et al., 2001).

A determinação dos níveis de açúcares revela as reservas prontamente disponíveis ao crescimento da planta, as quais são responsáveis pela formação de uma variedade de componentes estruturais nas células (Raven et al., 2001). A adição de açúcares em meio de cultura é devida à baixa taxa fotossintética existente nos explante, servindo, assim, como fonte de energia para o desenvolvimento do explante.

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia para indução de calogênese *in vitro* em explantes foliares de copaíba, bem como estabelecer a curva de crescimento de calos e analisá-los bioquimicamente através dos teores de proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis totais e açúcares redutores.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Efeito do 2,4-D e BAP na indução de calos em explantes foliares de copaíba

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

5.1.1 Coleta e assepsia dos explantes

Os explantes constituíram-se de segmentos foliares retirados de mudas obtidas através da germinação *in vivo* de sementes provenientes de plantas adultas cultivadas em Lavras (MG).

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em água destilada e autoclavada com gotas de detergente por 10 minutos, seguidos de imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto e, em seguida, passados em uma solução de hipoclorito de sódio (1,25% i.a.) durante 15 minutos. Ao final do processo de desinfestação, os explantes foram lavados em água destilada e autoclavada por cinco vezes.

5.1.2 Inoculação dos explantes

Explantes foliares com 1,0 cm² de área foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7,0 g L⁻¹ de ágar e acrescido de diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-Benzilaminopurina (BAP).

O efeito conjunto de 2,4-D e BAP foram estudados através das possíveis interações entre as seguintes concentrações de reguladores (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0) e (0,0; 1,0 e 1,5) respectivamente.

O pH de meio de cultura foi ajustado para 5,8. Em seguida os tubos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, sob 16 horas de fotoperíodo com irradiância de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 60 dias, quando se avaliou o experimento em função do peso da biomassa fresca de calos (PBFC).

5.1.3 Análises Estatísticas

O experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por quatro tubos de ensaio. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 4 x 3, sendo quatro concentrações de 2,4-D e três concentrações de BAP.

Os dados obtidos foram submetidos à interpretação estatística por meio da análise de variância, e as comparações múltiplas de médias foram realizadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5.2 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de copaíba

Para obtenção da curva de crescimento de calos, utilizaram-se explantes foliares oriundos de plantas obtidas da germinação *in vitro* de sementes de copaíba.

Explantes foliares com $1,0 \text{ cm}^2$ de área foram inoculados em tubos de ensaio (um explante por tubo) contendo 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, 30 g L^{-1} de sacarose, solidificado com $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar e com pH ajustado para 5,8. Os tubos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Os explantes permaneceram

em sala de crescimento a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob 16 horas de fotoperíodo com irradiância de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para a determinação da curva de crescimento dez tubos selecionados aleatoriamente foram pesados em intervalos de quatorze dias, durante um período de 168 dias. As pesagens foram realizadas a partir do primeiro dia da inoculação (tempo 0).

O percentual de crescimento dos calos foi determinado segundo a equação utilizada por Lameira (1997):

$$\% \text{crescimento} = \frac{Pf - Pi}{Pf} \times 100$$

Onde Pi = Peso inicial e Pf = peso final de calos.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por pesagem.

5.3 Análises bioquímicas de calos de copaíba

Os teores de proteínas totais, aminoácidos, açúcares redutores e açúcares solúveis totais foram obtidos de calos formados a partir de explantes foliares de plantas de copaíba germinadas *in vitro* e inoculados em meio MS suplementados com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D.

Para a realização das análises bioquímicas, utilizaram-se intervalos de 28 dias para as coletas de calos, durante um período de 168 dias de cultivo. Pesaram-se 300 mg de calos para cada repetição, num total de duas, os quais em seguida foram imersos em nitrogênio líquido e armazenados em freezer à temperatura de -80°C .

O procedimento para a obtenção do extrato bruto dos calos foi baseado na metodologia descrita por Lemos (1996). Cada amostra de 300 mg de calo foi homogeneizada em graal com 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH

7,5 e, posteriormente, centrifugada a 10000g, durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado do “pellet”, colocado em *ependorf* de 1,5 mL e posteriormente armazenado em freezer a -4°C para ser utilizado na quantificação de aminoácidos, açúcares redutores e açúcares solúveis totais. O “pellet” foi ressuscitado em 3,0 mL de NaOH 0,1N e centrifugado a 10000g, durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi colocado em *ependorf* de 1,5 mL, e armazenado em freezer à -4°C, para posterior quantificação de proteína.

5.3.1 Quantificação de açúcares solúveis totais

O teor de açúcares solúveis totais foi determinado segundo a metodologia descrita por Yemm & Willis (1954). Em alíquotas de 10µL do extrato bruto foram adicionadas 990 µL de água destilada e 2,0 mL do reagente antrona (20 mg de antrona, 0,5 mL de água destilada e 10 mL de H₂SO₄ concentrado). Após agitação, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos. Estas foram levadas para leitura em espectrofotômetro a 620 nm. Os valores foram expressos em miligramas de glicose por grama de biomassa fresca (mg glicose g⁻¹ de BF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose.

5.3.2 Quantificação de açúcares redutores

A determinação dos açúcares redutores foi realizada através da metodologia descrita por Miller (1959), utilizando-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em alíquota de 400 µL do extrato bruto, foram adicionados 1,1 mL de água destilada e 1,0 mL do reagente DNS. A mistura formada foi homogeneizada em agitador e levada ao banho-maria a 100°C por 5 minutos, sendo posteriormente resfriada à temperatura ambiente. As amostras foram levadas para leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores foram

expressos em miligramas de glicose por grama de biomassa fresca (mg glicose g^{-1} de BF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose.

5.3.3 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), que se baseia no princípio da associação entre proteína e corante. Em alíquotas de 600 μL do extrato bruto foram adicionados água destilada e 5,0 mL do reagente Commassie Blue, constituído de 0,01% de Commassie Blue G-250, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em agitador, para o procedimento da leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores foram expressos em miligramas de proteína por grama de biomassa fresca ($\text{mg proteína g}^{-1}$ de BF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de soro-albumina bovina (BSA).

5.3.4 Quantificação de aminoácidos

Os teores de aminoácidos foram determinados segundo o método descrito por Stein & Moore (1948). Em alíquotas de 10 μL do extrato bruto foram adicionados 990 μL de água destilada. Foi adicionado, também, 1,7 mL dos reagentes ABC (A - tampão citrato de sódio 0,2M, pH 5,0; B - reagente de ninhidrina 5% em metilcelosolve e C - KCN 2% em metilcelosolve). Posteriormente, as misturas foram agitadas e levadas ao banho-maria a 100°C durante 20 minutos. Para leitura a 570 nm em espectrofotômetro, foi adicionado 1,3 mL de etanol 60% (v/v). Os valores foram expressos em miligramas de aminoácidos por grama de biomassa fresca ($\text{mg aminoácidos g}^{-1}$ de BF), com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicina.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito do 2,4-D e BAP na indução de calos em explantes foliares de copaíba

Os reguladores 2,4-D e BAP apresentaram efeitos significativos sobre o peso da biomassa fresca de calos obtidos em explantes foliares de copaíba oriundos de plantas *in vitro*. Aos sessenta dias de cultivo, foi verificado o maior acúmulo de biomassa (0,092 g) em calos de copaíba obtidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. O menor incremento de matéria fresca (0,010 g), foi obtido em meio sem adição do regulador 2,4-D (Tabela 3).

TABELA 3. Peso da biomassa fresca em calos (g) de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) formados a partir de segmentos foliares e inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Reguladores de crescimento	Biomassa fresca de calos (g)
Sem regulador	0,010 e
1,0 mg L ⁻¹ de BAP	0,018 e
1,5 mg L ⁻¹ de BAP	0,020 e
1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,032 d
1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L ⁻¹ de BAP	0,044 c
1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ de BAP	0,066 b
2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,048 c
2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L ⁻¹ de BAP	0,092 a
2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ de BAP	0,058 b
3,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D	0,048 c
3,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L ⁻¹ de BAP	0,040 c
3,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D + 1,5 mg L ⁻¹ de BAP	0,030 d

Médias distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Barbosa et al. (2001) que verificaram 100% de formação de calos em epicótilo de plantas de copaíba, na presença de 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, sendo que menores percentagens de formação de calo ocorreram em meio de cultura na ausência de 2,4-D.

Para Bonilla (2002) o maior incremento no peso de matéria fresca de calo em explante foliar de chá-de-bugre foi obtido utilizando 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D em condição de ausência de luz. Landa et al. (2000) obtiveram melhor indução de calo em explante foliar de pequi (*Caryocar brasiliense*) utilizando 2,0 mg L⁻¹ de ANA + 0,5 mg L⁻¹ de BAP, em meio de cultura WPM.

Santos (2001) estudando a calogênese em explantes foliares de cafeeiro, concluiu que a máxima produção de calos foi obtida utilizando 1,0 e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D.

6.2 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de copaíba

A Figura 9 mostra o aspecto geral dos calos formados em segmentos foliares de copaíba inoculados em meio MS na presença de 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

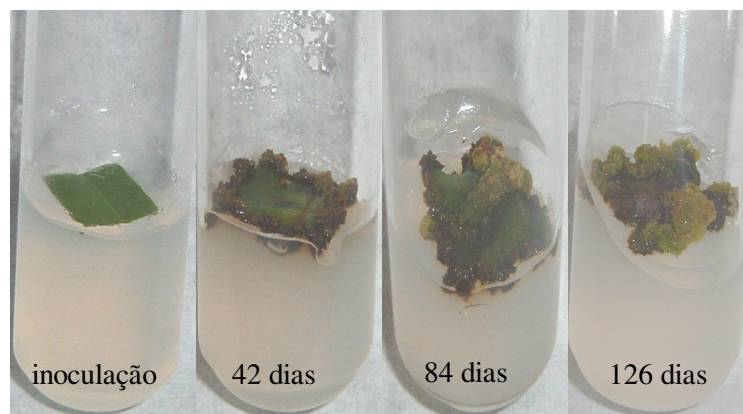


FIGURA 9. Aspecto geral de calos de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. UFLA, Lavras – MG, 2002.

A curva de crescimento de calos de copaíba apresentou um padrão tipo sigmóide, podendo-se distinguir cinco fases (Figura 10). Este tipo de curva de crescimento sigmóide já foi observado para espécies de plantas lenhosas como erva-baleira (Lameira, 1997), lechieira (Mesquita, 1999), castanha-do-brasil (Serra et al., 2000), cafeeiro (Santos, 2001) e chá-de-bugre (Bonilla, 2002).

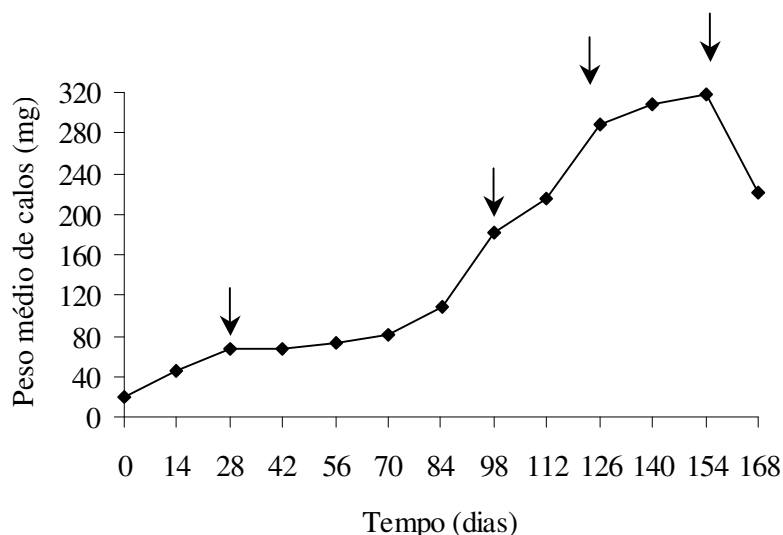


FIGURA 10. Curva de crescimento de calos de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002.

A fase Lag, na qual as células preparam-se para a divisão celular, ocorreu até o 28º dia de inoculação, representando um aumento de 69% no crescimento. Serra et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes avaliando o crescimento de calos em segmentos foliares de castanha-do-brasil, observando que a fase lag ocorreu até o trigésimo dia após inoculação. Autores como Scragg & Allan (1993) consideram a fase lag como a produtora de energia para o desenvolvimento dos calos.

A fase de crescimento exponencial, período no qual se observa máxima divisão celular, ocorreu entre 28º e o 98º da após inoculação, obtendo-se um incremento de 63% no crescimento *in vitro* durante esta fase, considerada por Scragg & Allan (1993) como fase biossintética. Em plantas de lechieira, esta fase foi observada entre o 21º e o 49º dia após a inoculação (Mesquita, 1999), e

em calos de segmentos foliares de castanha-do-brasil, essa fase ocorreu entre o 30° e 53° dia após a inoculação (Serra et al., 2000).

O período de crescimento linear, no qual os calos diminuem a divisão celular e aumentam a área celular, foi observado entre 98° e 126° dia após inoculação, representando 37% de aumento no crescimento *in vitro* durante esta fase.

Entre o 126° e 154° dia após a inoculação, observouse o período de desaceleração do crescimento, o qual apresentou um incremento de apenas 9% de biomassa. Segundo Smith (1992), essa fase é a indicada para efetuar a transferência do calo para outro meio de cultura fresco, em virtude das limitações nutricionais, liberação de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células e do calo. Assim, os resultados obtidos indicam que a repicagem de calos obtidos através da inoculação de segmentos foliares de copaíba devem ser efetuados entre o 126° e 154° dias de cultivo dos explantes.

A fase estacionária ocorreu a partir do 154° dia após a inoculação, sendo esta a fase em que não ocorre mais divisão celular e nem síntese de biomassa.

O número de dias necessários para a obtenção da curva de crescimento de calos, apresentando as cinco fases de crescimento, é variável de acordo com a espécie. Observou-se que a curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de copaíba é lenta em relação a espécies como erva-baleira (27 dias) (Lameira, 1997); castanha-do-brasil (90 dias) (Serra et al., 2000); cafeeiro (84 dias) (Santos, 2001) e chá-de-bugre (53 dias) (Bonilla, 2002).

6.3 Análises bioquímicas de calos de copaíba

6.3.1 Quantificação de açúcares solúveis totais

Os teores de açúcares solúveis totais presentes em calos formados a partir de explantes foliares de copaíba apresentaram um acúmulo crescente com o tempo até o 84º dia após inoculação, ficando variável os seus teores nos calos a partir deste dia (Figura 1).

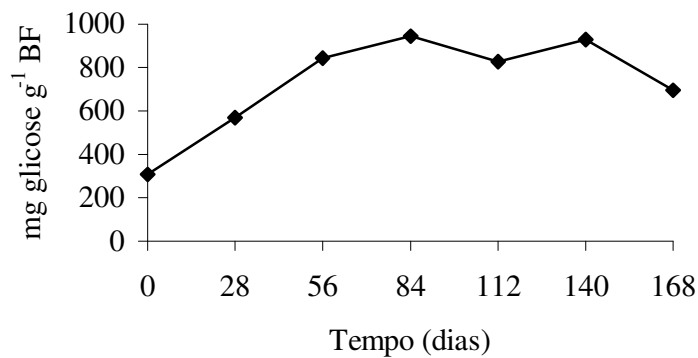


FIGURA 11. Teores de açúcares solúveis totais de calos de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) formados com base em segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002.

O acúmulo máximo ocorreu no 84º dia após inoculação e o mínimo, observado no dia da inoculação dos explantes.

Os teores máximos de açúcares solúveis totais observados até o 84º dia após a inoculação mostraram um aumento de aproximadamente 208% em relação ao teor inicial (307,27 mg glicose g⁻¹ BF). Este resultado indica que possivelmente ocorreu absorção de sacarose do meio de cultura pelo explante.

O aumento dos teores de açúcares solúveis totais ocorridos até o 84º dia após a inoculação coincide com as fases de crescimento do calo lag e exponencial.

No 168º dia de cultivo, o teor de açúcares solúveis totais reduziu para 696,35 mg glicose g⁻¹ BF, o que representa 127% do teor inicial. Esta redução pode estar relacionada com um possível esgotamento de açúcares do meio nutritivo.

Os teores de açúcares solúveis totais obtidos em calos de moreira (*Chlorophora tinctoria*) também apresentaram um comportamento semelhante, com um aumento, e depois redução dos teores; porém, vale ressaltar que o período de obtenção dos mesmo foi de 30 dias (Paiva Neto, 1996).

6.3.2 Quantificação de açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores observados em calos formados a partir de explantes foliares de copaíba estão representados na Figura 12.

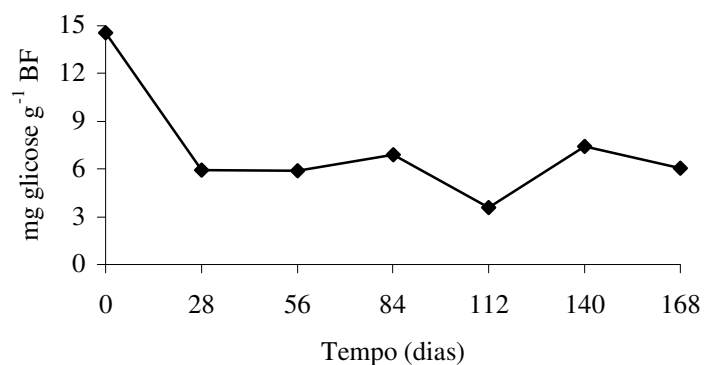


FIGURA 12. Teores de açúcares redutores de calos de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) formados com base em segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002.

O teor máximo (14,57 mg glicose g⁻¹ BF) de açúcares redutores foi observado no dia da inoculação do explante e o mínimo (3,54 mg glicose g⁻¹ BF), observado no 112º dia de cultivo.

No 28º dia após a inoculação, a redução nos teores apresentou declínio, atingindo um nível equivalente a 59% do valor inicial, período este coincidente com a fase lag de crescimento dos calos. Essa redução nos teores indica uma possível produção de energia a ser utilizada nas fases seguintes de crescimento do calo.

Entre o 28º e o 84º dia de cultivo, os teores mantiveram-se praticamente constantes. Para o período compreendido entre o 84º e o 112º dia após inoculação, os teores de açúcares redutores caíram 48% em relação ao 84º dia, voltando a subir no período entre o 112º e o 140º dia após inoculação.

Resultados contraditórios foram observados em calos de moreira cultivados na presença de 2,4-D, em que os teores de açúcares redutores apresentaram uma tendência de aumento até o 20º dia após a inoculação, quando houve uma redução até o 30º dia após a inoculação (Paiva Neto, 1996).

Serra et al. (2000) também observaram uma grande diminuição no teor de açúcares redutores a partir do dia de inoculação para calos de castanha-do-brasil, sendo mais acentuada até o 30º dia de inoculação, período que também coincidiu com a fase lag da curva de crescimento.

6.3.3 Quantificação de proteínas totais

Os teores de proteínas totais de calos de copaíba formados a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D estão apresentados na Figura 13.

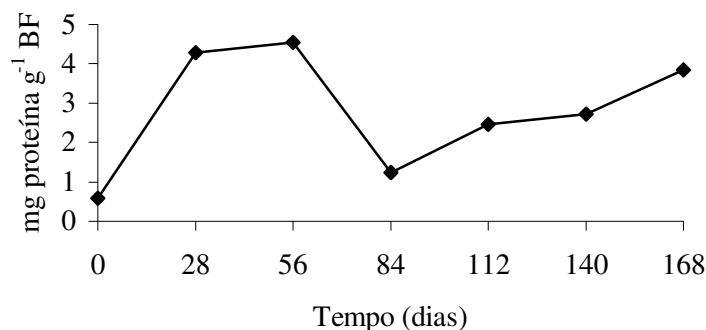


FIGURA 13. Teores de proteínas totais de calos de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) formados com base em segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002.

O teor de proteína observado até o 28º dia após inoculação mostrou um aumento de aproximadamente 629% em relação ao teor inicial (0,587 mg proteína g⁻¹ BF), atingindo seu valor máximo de 4,54 mg proteína g⁻¹ BF no 56º dia após a inoculação.

A elevação nos teores de proteínas observada até o 28º dia após a inoculação foi coincidente com a fase lag da curva de crescimento dos calos. Esta elevação pode expressar a síntese de novas proteínas, formadas possivelmente com a degradação de carboidratos necessária para a produção de energia a ser utilizada na fase exponencial de crescimento do calo.

A partir do 56º dia após a inoculação, os teores de proteínas totais apresentaram uma significativa redução até o 84º, a partir do qual voltaram a subir novamente, porém com aumento cumulativo de 150% até o 168º dia após inoculação. A redução dos teores observada neste período coincide com a fase exponencial de crescimento, indicando, portanto, que houve consumo dessas

proteínas, pois é nesta fase que ocorrem maiores taxas de divisão celular, necessitando, portanto, de mais energia.

Resultados obtidos por Mesquita et al. (2002) demonstraram que o acúmulo máximo de proteínas totais em explantes foliares de lechiera cultivado *in vitro* foi obtido 42 dias após a inoculação.

Em calos formados em explantes foliares de castanha-do-brasil, observaram-se os teores máximos de proteínas aos 30 dias após a inoculação, período que coincidiu também com a fase lag da curva de crescimento de calos (Serra et al., 2000).

Os mesmos autores observaram ainda que, após o 30º dia de inoculação, os teores de proteína apresentaram uma redução até o 60º dia, período em que iniciou a fase de desaceleração da curva de crescimento, podendo esta redução estar relacionada com a diminuição dos nutrientes disponíveis no meio de cultura. Resultados semelhantes também foram observados em calos de moreira (Paiva Neto, 1996).

6.3.4 Quantificação de aminoácidos

Para os teores de aminoácidos observados em calos de copaíba a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D verificou-se que o maior acúmulo ocorreu aos 56 dias após a inoculação (Figura 14).

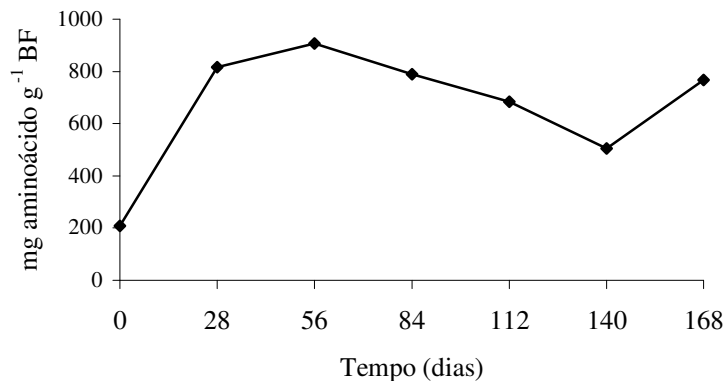


FIGURA 14. Teores de aminoácidos de calos de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) formados com base em segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, durante 168 dias. UFLA, Lavras – MG, 2002.

O teor de aminoácidos observado até o 28º dia após a inoculação mostrou um aumento de aproximadamente 291% em relação ao teor inicial (208,47 mg aminoácidos g⁻¹ BF), atingindo seu valor máximo no 56º dia após a inoculação. Este aumento no teor de aminoácidos possivelmente ocorreu em resposta a uma absorção considerável do íon amônio e de glicina presentes no meio de cultura. Segundo George et al. (1988), a presença de amônio no meio de cultura resulta no aumento da síntese de aminoácidos, os quais são produzidos utilizando energia liberada no catabolismo dos carboidratos.

Paiva Neto (1996) obteve em calos de Moreira, teor máximo de aminoácidos no 20º dia após a inoculação.

Em calos originados de segmentos foliares de castanha-do-brasil, Serra et al. (2000) observaram que os teores de aminoácidos até o 15º de inoculação apresentaram um ganho de 858% em relação ao teor inicial, o qual atingiu valor máximo aos 30 dias de cultivo. Os autores observaram, ainda, que esses teores coincidiram com a fase lag de crescimento dos calos.

Entre o 56° e o 140 dia após a inoculação, os teores de aminoácidos apresentaram redução de 44% em relação ao valor máximo obtido (906,21 mg aminoácidos g⁻¹ BF). Esta redução pode estar relacionada com a diminuição dos nutrientes disponíveis no meio de cultura.

Serra et al. (2000) também obtiveram redução nos teores de aminoácidos a partir do 30° dia de inoculação, em estudos realizados com calos obtidos de segmentos foliares de castanha-do-brasil.

7 CONCLUSÕES

A utilização do meio MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de BAP em combinação com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D induz a formação de calos em segmentos foliares de *Copaifera langsdorffii*.

A curva de crescimento de matéria fresca de calos formados a partir de explantes foliares de copaíba, apresenta crescimento sigmóide, com cinco fases.

O período de repicagem dos calos formados em segmentos foliares de copaíba está entre 126 e 154 dias após a inoculação dos explantes.

O período das fases lag e exponencial de crescimento coincidem com maior teor de açúcar solúvel total obtido em calos.

Altos teores de açúcares redutores estão presentes apenas no primeiro dia de inoculação dos explantes.

A análise quantitativa de aminoácidos e proteínas indica que a alta síntese ou absorção de aminoácidos ocorre principalmente na fase lag de crescimento de calos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITCHISON, P.A. MACLEOD, A; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) culture. In: STREET, H.E. (Ed.). **Pant tissue and cell culture**. 2.ed. California: Blackwell Scientific, 1977. p.267-306.

BARBOSA, W.C. et al. Calogênese em epicótilos de plântulas produzidas *in vitro* de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus, 2001. **Resumos expandidos**. Ilhéus, 2001. Cd-Room.

BONILLA, M.G.O. **Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.** 2002. 162p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: parte 1 – the technology**. 2.ed. Edington: Exergetics, 1993. 574p.

GEORGE, E.F.; PUTTOCK, J.M.; GEORGE, H.J. **Plant culture media: commentary and analysis**. England: Exegetics, 1988. 420p.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRE, A.C.; CALDAS, L.S (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 203-212.

LAMEIRA, O.A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LANDA, F.S.L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.56-63, dez. 2000. Edição Especial.

LEMOS, G.B. **Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio.** 1996. 56p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

MESQUITA, A.C. **Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos** 1999. 67p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

MESQUITA, A.C. et al. Análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) **Magistra**, Cruz das Almas, v.14, n.1, p.1-7, jan./jun. 2002.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v.31, p.426-428, 1959.

MURASHIGE, T. Plant regeneration through tissue cultures. **Annual Review Plant Physiology**, Washington, v.25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, n.3, p.473-497, Mar. 1962.

PAIVA-NETO, V.B. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud).** 1996. 39p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

PIERIK, R.L.M. ***In vitro* culture of higher plants.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. 345p.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1990. 326p.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal.** 6.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001. p.17-39.

SANTOS, C.G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.** 2001. 110p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

SCRAGG, A.H. ; ALLAN, E.J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quassia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**. Berlím: Springer-Verlag, 1993. v.21, p.249-268.

SERRA, A.G.P.; PAIVA, R.; PAIVA,P.D.O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.4, p.833-840, out./dez. 2000.

SHIMIZU, T. et al. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v.40, p.125-129, 1977.

SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic, 1992. 171p.

STEIN, W.; MOORE, S. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesday, v.176, p.367-372, 1948.

YEMM, E.W. ; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, p.508-514, 1954.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos estudos realizados com *Copaifera langsdorffii*, alguns resultados importantes foram observados:

A melhor condição para a germinação *in vitro* de sementes de copaíba é através do uso de sementes escarificadas e inoculadas em meio MS sem adição de sacarose.

As plantas cultivadas *in vitro* apresentaram estruturas anatômicas com os tecidos diferenciados, sendo estes semelhantes aos de cultivo em campo. A presença de canais secretores nas folhas, importantes para extração do óleo-resina, foi observado em ambos os materiais.

Para a obtenção de brotações em segmentos nodais de copaíba, sugere-se a utilização do meio MS suplementado com 0,83 e 0,86 mg L⁻¹ de BAP.

É possível a indução de calos em segmentos foliares de copaíba com o uso de 1,0 mg L⁻¹ de BAP em combinação com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, em meio MS, os quais apresentam crescimento tipo sigmóide.

Mudanças bioquímicas (açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas e aminoácidos) em calos de copaíba, ocorrem principalmente nos primeiros 56 dias após a inoculação, correspondente ao período de maior divisão celular.

ANEXOS

	Página
QUADRO 1	Resumo da análise de variância para percentagem de germinação de sementes não escarificadas e escarificadas e provenientes de Rio Branco (AC) (<i>Copaiifera multijuga</i>) e Minas Gerais (MG) (<i>Copaiifera langsdorffii</i>), germinadas <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras – MG, 2001 85
QUADRO 2	Resumo da análise de variância para a percentagem de germinação de sementes de copaíba (<i>Copaiifera langsdorffii</i>) em diferentes concentrações de sacarose e na presença e ausência de GA ₃ 85
QUADRO 3	Resumo da análise de variância para espessura da epiderme adaxial (EAD), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), epiderme abaxial (EAB) e limbo (LB) foliar de copaíba (<i>Copaiifera langsdorffii</i>) em µm..... 86
QUADRO 4	Resumo da análise de variância para tamanho de brotações (TB) e biomassa seca de brotação (BSB) em segmentos nodais de copaíba (<i>Copaiifera langsdorffii</i>).. 86
QUADRO 5	Resumo da análise de variância para peso da biomassa fresca de calos (PBFC), em calos de explantes foliares de copaíba (<i>Copaiifera langsdorffii</i>)..... 86

ANEXOS

QUADRO 1. Resumo da análise de variância para percentagem de germinação de sementes não escarificadas e escarificadas e provenientes de Rio Branco (AC) (*Copaifera multijuga*) e Minas Gerais (MG) (*Copaifera langsdorffii*), germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras – MG, 2001.

Fonte de variação	GL	QM	F
Procedência	1	0,0321	0,3369 ^{N.S}
Escarificação	1	0,4325	0,0009*
Procedência x escarificação	1	0,0035	0,7477 ^{N.S}
Resíduo	44	0,0341	
Média	1,25		
C.V (%)	14,77		

Dados transformados: $\bullet X+1,0$.

^{N.S}, * = não significativo e significativo ao nível de 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste Scott-Knott.

QUADRO 2. Resumo da análise de variância para a percentagem de germinação de sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em diferentes concentrações de sacarose e na presença e ausência de GA₃. UFLA, Lavras – MG, 2001.

Fonte de variação	GL	QM	F
Giberelina	1	0,0128	0,5468 ^{N.S}
Sacarose	4	0,2409	0,0001*
Giberelina x Sacarose	4	0,0736	0,0869 ^{N.S}
Resíduo	110	0,0352	
Média	1,21		
C.V (%)	15,5		

Dados transformados: $\bullet X+1,0$.

^{N.S}, * = não significativo e significativo ao nível de 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste Scott-Knott.

QUADRO 3. Resumo da análise de variância para espessura da epiderme adaxial (EAD), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), epiderme abaxial (EAB) e limbo (LB) foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em µm. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de variação	GL	EAD	PP	PE	EAB	LB
Ambiente de cultivo	2	0,2712*	71,6992*	27,3917*	0,0672*	211,888*
Resíduo	36	0,009552	0,06912	0,411888	0,007776	0,050529
Média	-	9,12	31,54	65,23	8,04	113,76
C.V (%)	-	5,24	4,08	4,82	5,37	3,06

* = significativo a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

QUADRO 4. Resumo da análise de variância para tamanho de brotações (TB) e biomassa seca de brotação (BSB) em segmentos nodais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de variação	GL	TB (cm)	BSB (g)
Meio de cultura	1	3,5378*	0,001568*
BAP	4	2,2317*	0,000942*
Meio x BAP	4	2,1673*	0,000598*
Resíduo	40	0,1729	0,000090
Média	-	2,30	0,029
C.V (%)	-	18,06	32,94

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

QUADRO 5. Resumo da análise de variância para peso da biomassa fresca de calos (PBFC) em calos de explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de variação	GL	PBFC (g)
2,4-D/ BAP	11	0,002609*
Resíduo	48	0,000094
Média	0,0421	-
C.V (%)	23	-

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.