



GERMINAÇÃO E INDUÇÃO DA CALOGÊNESE *IN VITRO* DE COPAÍBA

Rafael Fonsêca Zanotti^{1*}, Fernanda Raquel Sartor¹, Kátia Ferreira Pôssa², Anderson Martins Pilon¹, Claudio Hiroshi Fukushima¹

¹ Av. Oraidia Mendes de Castro, nº6000, Sala 25 Novo Silvestre Parque Tecnológico - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA Viçosa - MG CEP: 36570-000)
(rfzanotti@gmail.com)

² Universidade Federal de Lavras

*Autor para Correspondência.

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

A *Copaifera langsdorffii* é uma espécie florestal nativa brasileira ameaçada de extinção e com propriedades medicinais comprovadas. No entanto possui dificuldades na sua propagação devido à dormência das sementes. A micropropagação é uma técnica que permite a propagação em escalabilidade e com segurança fitossanitária. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação *in vitro* de sementes e a calogênese de explantes foliares de copaíba. As sementes foram desinfestadas e colocadas para germinar em meios de cultura MS e WPM, acrescidos de agente gelificante Gelrite[®] 3 gL⁻¹ com concentração total dos sais ou 50% dependendo do tratamento. Além disso, foi avaliado necessidade de suplementação ou ausência de sacarose (30 gL⁻¹) no meio de cultura, sob luz constante. Após 30 dias após o início germinação *in vitro* foram retirados explantes foliares em fluxo laminar e transferidos para placa de petri, mantidos no escuro. Os tratamentos utilizados foram os meios de cultura MS e WPM, acrescidos de agente gelificante Gelrite[®] 3 gL⁻¹, sacarose (30gL⁻¹) e pH ajustado em 5,8, antes da autoclavagem. Foram utilizados os reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido 2,4-dicloroacético (2,4-D). O meio de cultura MS com a concentração total de sais, em geral, possibilitam maiores porcentagem de germinação. Os meios de tratamentos MSB15D15- Meio MS com 15 µM de BAP e 15 µM de 2,4-D; MSB15D5- Meio MS com 15 µM de BAP e 5 µM de 2,4-D e WPMB15D15- Meio WPM com 15 µM de BAP e 15 µM de 2,4-D são os que permitem as maiores frequências de calos primários.

PALAVRAS-CHAVE: Calos, *Copaifera langsdorffii*; meios de cultura; reguladores de crescimento

IN VITRO GERMINATION AND CALOGENESIS INDUCTION OF COPAIBA

ABSTRACT

The *Copaifera langsdorffii* is a Brazilian native forest specie threatened with extinction and with proven medicinal properties. Micropropagation is a technique that allows propagation in scalability and phytosanitary security. The aim of this study was

to evaluate the *in vitro* germination of seeds and callus formation from leaf explants of copaiba. Seeds were sterilized and germinated in culture media MS and WPM with gelling agent Gelrite® 3 g/L with total concentration of salts or 50% depending on the treatment. Furthermore, was evaluated need for supplementation or absence of sucrose (3 g/L) in culture medium under constant light. After 30 days after initiation *in vitro* germination leaf explants were removed under laminar flow and transferred to a petri dish and kept in the dark. The treatments were the culture media MS and WPM plus gelling agent Gelrite® 3 g/L and sucrose (3 g/L) and pH 5.8, before autoclaving. We used growth regulator 6-benzylaminopurine (BAP) and 2,4-dichloroacetic acid (2,4-D). The MS culture medium with the total concentration of salts in general allow greater percentage of germination. The means of treatments MSB15D15 –Media MS com 15 µM de BAP e 5 µM de 2,4-D e WPMB15D15- Media WPM com 15 µM de BAP e 15 µM de 2,4-D are those that enable the highest frequencies of callus primary.

KEYWORDS: callus; growth regulator; *Copaifera langsdorffii*, tissue culture media

INTRODUÇÃO

A copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) é uma espécie com grande plasticidade ecológica, sendo encontrada em vários habitat, principalmente no Cerrado e Cerradão, porém atualmente encontra-se na lista das espécies ameaçadas de extinção (AMBIENTE BRASIL, 2012). Além disso, a copaíba é uma importante espécie florestal com características medicinais como bactericida e cicatrizante (VASCONCELOS *et al.*, 2008; ESTEVÃO *et al.*, 2009). Porém a propagação dessa espécie é dificultada por causa da dormência das sementes causada pela deposição de cumarina no tegumento (RIZZINI, 1976).

Como forma de propagação vegetativa, a cultura de tecidos vegetais apresenta como uma das principais vantagens aumentando em grande escala o número de indivíduos e garantindo a manutenção da biodiversidade, por causa da conservação do germoplasma (SARTOR *et al.*, 2012), permitindo a reprodução do componente genético total e, portanto, tendo maiores ganhos em uma mesma geração. A cultura de tecidos em espécies lenhosas vem se destacando nos últimos anos, pois é considerada uma tecnologia adequada à implantação de florestas clonais garantindo a superioridade genética dos indivíduos, porém ainda existem muitas dificuldades a serem superadas (DUTRA *et al.*, 2009).

Dentre as técnicas de estabelecimento *in vitro* de tecidos vegetais a calogênese se destaca. Esta técnica consiste em utilizar a cultura de calos obtidos *in vitro* e posterior arranjo de células. Para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante, especialmente, de tecidos jovens (MOURA *et al.*, 2008). Essas estruturas permitem posteriormente a regeneração de plantas por embriogênese somática ou por organogênese (CARVALHO *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2012).

A germinação de sementes *in vitro* e a micropropagação também se destacam na cultura de tecidos, a partir de segmentos nodais e ápices caulinares de plântulas ou indivíduos adultos. No entanto, estudos de meios de cultura que favoreçam a germinação *in vitro* são importantes, tanto para maximizar a taxa de germinação como para obter plântulas com qualidade (ROSA *et al.*, 2012). A partir do conhecimento dessas espécies e com os avanços da biotecnologia vegetal, a propagação *in vitro* é uma alternativa a ser considerada para a produção em larga escala de mudas de plantas nativas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar germinação de sementes *Copaifera* e a

posterior indução da calogênese dos explantes *in vitro* em diferentes meios de cultura.

METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de nutrição e metabolismo vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Um lote de 1600 sementes foram desinfestadas com imersão em solução alcoólica a 70%, durante um minuto seguida de imersão em hipoclorito de sódio comercial puro (2% de cloro ativo), durante 20 minutos e três enxágues em água destilada e autoclavada, por 30 segundos cada enxágue.

As sementes foram escarificadas mecanicamente através de punção na testa com bisturi. Em seguida as sementes foram colocadas sob papel estéril, para absorção do excesso de água, e posteriormente inoculadas em meio de cultura.

Foram utilizados os meios de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & McCOWN, 1981), acrescidos de agente gelificante Gelrite® 3 gL⁻¹ com concentração total dos sais ou 50% dependendo do tratamento. Além disso, foi avaliada a necessidade de suplementação ou ausência de sacarose (30 gL⁻¹) no meio de cultura, sob luz constante. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento. Os dados foram expressos na forma de estatística descritiva.

Após 30 dias após o início da germinação *in vitro* foram retirados explantes foliares em fluxo laminar e transferidos para placa de petri, mantidos no escuro. Os tratamentos utilizados foram os meios de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & McCOWN, 1981), acrescidos de agente gelificante Gelrite® 3 gL⁻¹, sacarose (30g⁻¹) e pH ajustado em 5,8, antes da autoclavagem. Foram utilizados os reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido 2,4-dicloroacético (2,4-D). Foram realizados os seguintes tratamentos: **MSB15D15**- Meio MS com 15 µM de BAP e 15 µM de 2,4-D; **MSB15D5**- Meio MS com 15 µM de BAP e 5 µM de 2,4-D; **MSB5**- Meio MS com 5 µM de BAP; **WPMB15D15**- Meio WPM com 15 µM de BAP e 15 µM de 2,4-D; **WPMB15D5**- Meio WPM com 15 µM de BAP e 5 µM de 2,4-D; **WPMB5**- Meio WPM com 5 µM de BAP. Foram utilizadas 10 repetições com cinco explantes por tratamento. Os dados foram expressos na forma de estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes germinadas com a concentração total de sais (15%) foram cinco pontos percentuais maiores em relação as sementes germinadas com metade da concentração dos sais(10%) em geral para os dois meios basais. O meio de cultura MS (15%) proporcionou um aumento de quatro pontos percentuais na germinação em relação ao meio de cultura WPM (11%), (Figura 1).

Segundo AZEVEDO *et al.*, (2002) não encontraram diferenças estatísticas quando estudaram o efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de sementes de copaíba (*Copaiba* spp). No entanto a germinação de embriões *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), apresentaram redução quando os meios de cultura eram acrescido com sacarose (NOGUEIRA *et al.*, 2004).

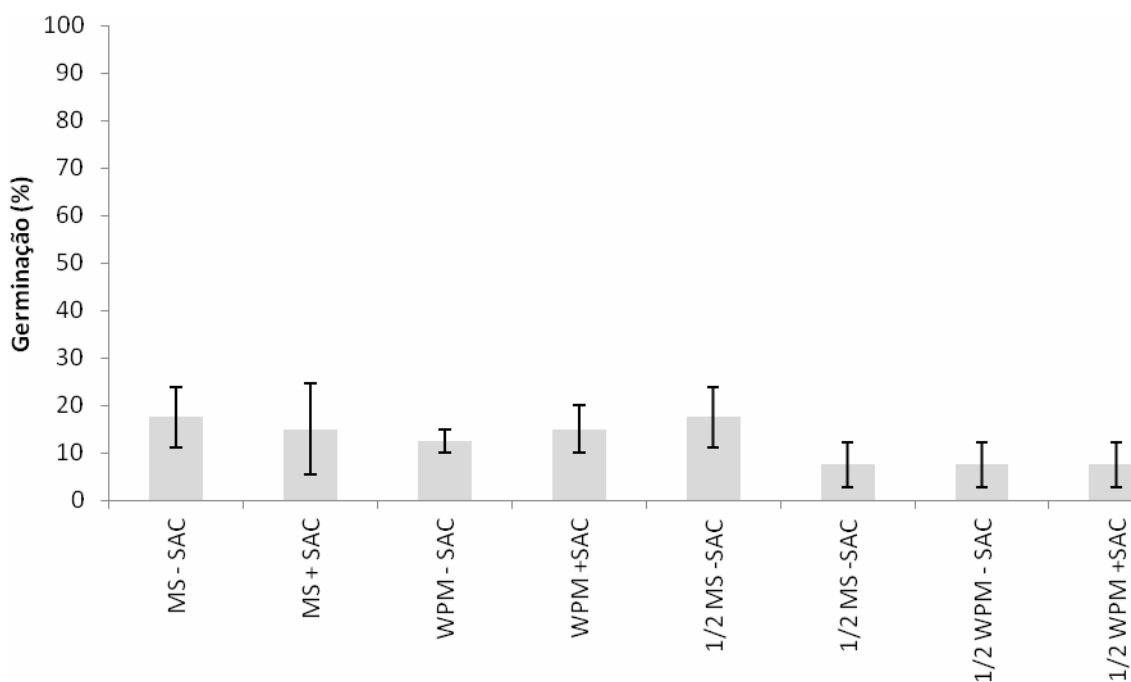


FIGURA 1. Porcentagem de germinação de copaíba *in vitro* em diferentes substratos.

As maiores frequências de calo primário foram obtidos quando utilizados conjuntamente, 15 μ M de BAP e 5 μ M de 2,4-D. O meio MS com 5 μ M de BAP foram os que mais oxidaram, aproximadamente 50% dos explantes. Não houve formação de calos quando se utilizou o meio de cultura WPMB5. A indução de calo é dependente de um balanço hormonal intermediário de auxinas e citocininas (NOGUEIRA *et al.*, 2007) como pode ser observado na figura 2. Segundo AZEVEDO (2003), a calogênese em copaíba (*Copaifera langsdorffii*) foi observado quando apresentava 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP em meio MS na presença de luz.

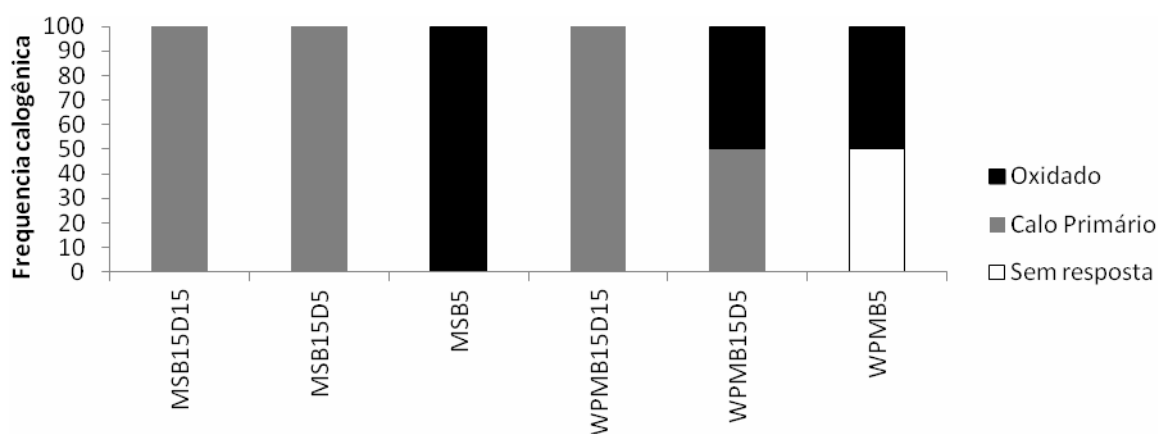


FIGURA 2. Frequência calogênica em explantes foliares de copaíba aos 84 dias.

CONCLUSÕES

O meio de cultura MS com a concentração total de sais, em geral, possibilitam maiores porcentagem de germinação. Os tratamentos MSB15D15, MSB15D5 e WPMB15D15 são os que permitem as maiores frequências de calos primários.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Viçosa, ao CNPq e FAPEMIG (pelas bolsas concedidas) e financiamento do projeto.

À seção Cultura de Tecidos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo do DBV-UFV, pela utilização das instalações.

Ao Dr. Antônio Teixeira Cordeiro, responsável pelo laboratório, pelas contribuições neste projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBIENTE BRASIL. **Fauna e Flora do Cerrado de Minas Gerais**. Disponível em: http://ambientes.ambientebrasil.com.br/natural/artigos/fauna_e_flora_do_cerrado_de_minas_gerais.html. Acesso em: 04 de outubro de /2012.

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calo e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

AZEVEDO, K. S. de; PAIVA, R.; SANTOS, C. G. dos. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação in vitro de sementes de copaíba (*Copaiba* spp). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: UFMT, 2002.

CARVALHO, D.C.; SILVA, A.L.P; TANNO, G.N.; PURCINO, M.; BIASI, L.A. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.1, p. 108-114, 2011.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagção de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009.

ESTEVIÃO, L. R. de M. et al. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 4, p. 406-412, 2009.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Ashville, v. 30, p.421-427, 1981.

MENEZES, T.S.A.; SANTOS, T.C.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.

Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista GEINTEC**, São Cristóvão, v.2, n. 1, p. 32-41, 2012.

MOURA, E.F.; MENEZES, I.C.; LEMOS, O.F. Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.72-76, 2008.

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

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; CASTRO, A.H.; VIEIRA, C.V.; ABBADE, L.C.; ALVARENGA, A.A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.1053-1054, 2004.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. DE A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. DE O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil** - aspecto ecológico. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1976, 202p.

ROSA, F.C.; REINIGER, L.R.S.; GOLLE, D.P.; MUNIZ, M.F.B.; CURTI, A.R. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1021-1026, 2012.

SARTOR, F.R.; MORAES, A.M.; ALMEIDA, F.A.C. TÉCNICAS PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS DE MANGA BEIRA. **Revista Agrotecnologia, Anápolis**, v.3, n.1, p.31-39, 2012

VASCONCELOS, K.R.F.; VEIGA JUNIOR, V.F.; ROCHA, W.C.; BANDEIRA, M.F.C.L. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (Suplemento), p.733-738, 2008.