



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CAMILA NASCIMENTO NETTO**

**CULTIVO *in vitro* DE *Copaifera sp.***

**São João Del-Rei – MG**

**2023**

**CAMILA NASCIMENTO NETTO**

**CULTIVO *in vitro* DE *Copaifera sp.***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Dom Bosco, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador (a): Profa. Fernanda Carlota Nery

**São João Del-Rei – MG**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB) e  
Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N476b

Netto, Camila Nascimento.

BIOTECNOLOGIA APLICADA NO CULTIVO IN VITRO DE  
ESPÉCIE DA AMAZÔNIA – PARTE 2 / Camila Nascimento Netto  
; orientadora Fernanda Carlota Nery. -- São João del Rei, 2023.  
27 p.

Trabalho de Conclusão (Graduação - Biotecnologia)  
- Universidade Federal de São João del-Rei, 2023.

1. Diodo emissor de Luz. 2. copaíba. 3. espécie florestal. 4. planta  
medicinal. I. Nery, Fernanda Carlota, orient. II. Título.

**CAMILA NASCIMENTO NETTO**

**CULTIVO *in vitro* DE *Copaifera sp.***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Dom Bosco, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

São João Del-Rei, 07 de julho de 2023.

Banca examinadora:

Dra. Rayris Cravo Herrera – UFPA

Dra. Taína Rocha - UFPA

---

Dra. Fernanda Carlota Nery

Orientadora

## Dedicatória

Aos meus pais, professores e amigos que me  
incentivaram e contribuíram para a realização  
deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Fernanda Carlota Nery pela oportunidade, confiança, por toda a ajuda, suporte durante o desenvolvimento do trabalho e pelos ensinamentos.

Agradeço aos membros da Banca pela disponibilidade de estarem presentes avaliando e auxiliando no trabalho.

À minha família e amigos pelo apoio e incentivo que me deram durante esse processo.

A todos que participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

Ào CNPq/UFSJ pelo financiamento do projeto.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	12
REVISÃO DE LITERATURA .....	14
Caracterização botânica e importância da espécie <i>Copaifera</i> sp. (Copaíba) .....	14
Uso de LEDs na propagação <i>in vitro</i> de plantas .....	15
Micropropagação .....	16
METODOLOGIA .....	18
Obtenção do material vegetal .....	18
Beneficiamento dos frutos e sementes .....	18
Germinação <i>in vitro</i> de sementes de copaíba.....	18
Organogênese <i>in vitro</i> : Efeito do BAP na indução de brotações .....	18
Organogênese <i>in vitro</i> : Calogênese .....	19
Aclimatização das plantas.....	19
PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO .....	19
RESULTADOS .....	20
GERMINAÇÃO IN VITRO DE SEMENTES DE COPAÍBA .....	20
INDUÇÃO DE BROTAÇÕES .....	21
ACLIMATIZAÇÃO .....	22
INDUÇÃO DA CALOGÊNESE .....	23
DISCUSSÃO .....	25
CONCLUSÃO .....	27
REFERÊNCIAS .....	28

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Semente de Copaíba.....	19
FIGURA 2. Semente de copaíba inoculadas .....	20
FIGURA 3. Semente inoculada com contaminação .....	20
FIGURA 4. Formação de plântulas em substrato de vermiculita + WPM .....	21
FIGURA 5. Explantes de segmentos nodais copaíba contaminados por fungos .....	21
FIGURA 6. Indução de brotação em explantes nodais de copaíba .....	22
FIGURA 7. Etapas de aclimatização de mudas de copaíba .....	22
FIGURA 8. Aspecto geral das plantas aclimatizadas de copaíba .....	23
FIGURA 9. Contaminação em explantes foliares .....	23
FIGURA 10. Formação de calos .....	24
FIGURA 11. Explantes submetidos aos tratamentos de indução de calogênese .....	24
FIGURA 12. Calos com a presença de fungos .....	24



## RESUMO

A floresta amazônica é considerada um banco de informações genéticas, químicas e ecológicas. As intensas atividades humanas levaram ao desmatamento e à extinção de espécies na região. Este problema é amenizado pelo uso de técnicas de conservação *ex situ*, como a cultura *in vitro* de células/tecidos, que permite a reprodução das plantas de forma controlada, rápida e segura. Dentre as plantas importantes dentro deste bioma encontra-se a *Copaifera spp.* que é uma espécie arbórea que possui vantagens econômicas, por exemplo, seu óleo que possui propriedades fitoterápicas utilizadas nas indústrias farmacêuticas. Diante da importância desta espécie torna-se necessários estudos de cultura de células vegetais *in vitro* visando a conservação *ex situ* de espécies medicinais. Associado ao cultivo *in vitro* temos diversos métodos, como o uso de lâmpadas LEDs (Diodo Emissores de Luz) que auxiliam nesse processo, pois, no tratamento *in vitro*, a luz fornecida afeta os resultados obtidos. O LED consiste no uso de luzes, com diferentes comprimentos de ondas, com a finalidade de intervir diretamente na morfofisiologia da planta. Neste trabalho, observou-se que o uso de LEDs na germinação *in vitro* acelerou a germinação, uma vez que a fotossíntese está ligada na relação quantidade/qualidade da luz. Obejtivou-se, neste trabalho, verificar a eficiência do uso de lâmpadas de LEDs coloridos como fonte luminosa monocromática e dicromática na propagação *in vitro* da copaíba. As sementes de copaíba foram beneficiadas e colocadas para germinar nos seguintes tratamentos: meio de cultura WPM sólido e WPM líquido + substrato vermiculita. Resultado superiores foram obtidos quando se utilizou substrato vermiculita e LED vermelho + azul, obtendo 70% de germinação de semente e 60% de germinação das sementes quando estas foram submetidas ao substrato vermiculita e LED branco. Após 30 dias as plantas foram aclimatizadas e obteve-se uma taxa de sobrevivência de 82,4%. Os segmentos nodais obtidas das plantas aclimatizadas foram submetidos à brotação com o meio WPM + BAP, obtendo-se a formação de brotos no tratamento sem a adição de BAP, independente da lâmpada LED estudada. Na etapa de calogênese, explantes foliares foram inoculados em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D + BAP e mantidos no escuro por 60 dias. O tratamento com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP apresentou melhores resultados. Observou-se a formação inicial de calos, em explantes foliares, a partir do 45º dia. A complexidade dos resultados obtidos é confirmada pela alta taxa de contaminação nos experimentos realizados, ressaltando a importância de se dedicar à conservação das espécies florestais e medicinais da Amazônia.

**Palavras chaves:** Diodo emissor de Luz; copaíba; espécie florestal; planta medicinal.

**Agência Financiadora:** CNPq e CAPES.

## INTRODUÇÃO

A Amazônia é detentora de mais da metade da biodiversidade do mundo, abrigando um imenso recurso florestal, que representa um terço das florestas tropicais, com milhares de espécies madeireiras de grande importância econômica e social (RAMOS, 2020). No entanto, a conservação da floresta e da sua biodiversidade representa um grande desafio, principalmente, pelo desmatamento que ocorre de maneira intensiva na região, segundo dados de 2021 do DETER (INPE), o Amazonas foi o segundo estado que mais desmatou e apresentou o maior crescimento na devastação em relação ao ano anterior. Isso porque a destruição registrada em solo amazense passou de 1.395 km<sup>2</sup> em 2020 para 2.071 km<sup>2</sup> em 2021, uma alta de 49%.

A Floresta Amazônica constitui um verdadeiro banco de informações genéticas, químicas e ecológicas, representando cada vez mais uma promissora fonte de exploração econômica para as indústrias de alta tecnologia, farmacêutica e outras. Todas essas informações subsidiaram a escolha da espécie dentro do contexto regional da Amazônia que necessitam de estudos na área da biodiversidade e conservação. Tendo em vista ainda a intensa exploração a qual são expostas estas espécies justifica-se a necessidade cada vez mais urgente de preservação.

A cultura de células e tecidos vegetais é uma das áreas mais bem sucedidas no ramo da biotecnologia. A manipulação de células e componentes celulares, manipulação de tecidos, produção rápida de mudas e em larga-escala e a adoção de técnicas para o melhoramento de plantas são apenas alguns exemplos das muitas áreas importantes na cultura de tecidos. Avanços no conhecimento da fisiologia do crescimento e desenvolvimento *in vitro* tem levado a otimização de métodos para acelerar e melhorar o desenvolvimento de plantas.

Para o sucesso de métodos de cultivo *in vitro* é necessário controle de todas as variantes, como a seleção dos explantes adequados, estabelecendo-se condições de desinfecção e cultura; o estabelecimento de condições físicas e fisiológicas de desenvolvimento dos explantes e o enraizamento das partes aéreas formadas após subcultivos sucessivos formando a planta completa.

A utilização da cultura de células e tecidos vegetais vem sendo valorizada pela possibilidade de conservação de espécies florestais, medicinais e ornamentais, pois permite a recuperação de substâncias farmacêuticas, a multiplicação segura de plantas desejáveis, a propagação rápida com alto coeficiente de multiplicação, e para salvaguardar o patrimônio genético de plantas ameaçadas pela exploração humana, dentre estas se destaca as plantas Amazônia. Vários são os trabalhos que têm demonstrado o potencial e a viabilidade de regeneração *in vitro*, no entanto, mesmo com alguns avanços, faltam estudos sobre o potencial de regeneração para garantir o sucesso da metodologia com espécies da Amazônia.

O uso de lâmpadas de diodos emissores de luz (LED) no cultivo *in vitro* de plantas é um

avanço recente para a técnica de cultura de tecidos vegetais. Ele baseia-se no uso de luzes com diferentes comprimentos de onda, com o intuito de influenciar diretamente na morfofisiologia e produção de compostos bioativos em vegetais. Essa estratégia biotecnológica foi desenvolvida devido ao fato da luz ser um dos principais fatores ambientais que influenciam na fisiologia de plantas. Assim, com o progresso da tecnologia LED houve uma consequente melhora no controle ambiental e nas respostas morfogênicas com uso da luz nos experimentos de cultura de tecidos em plantas (Batista et al., 2018). No Brasil, são escassos os trabalhos com uso de LEDs na propagação *in vitro* de plantas, sendo que essa tecnologia continua a evoluir rapidamente abrindo uma gama de possibilidades adicionais.

Diante do exposto, destaque-se que a propagação *in vitro* de uma espécie nativa, pouco explorada e com importante potencial medicinal requer uma atenção maior. Tal campo de pesquisa torna-se ainda mais explorável quando há a possibilidade de agregar-se técnicas biotecnológicas promissoras, como o uso de LEDs, permitindo o controle da intensidade e comprimento da onda para o melhoramento dos resultados. Assim, é interessante investigar os efeitos do uso de LEDs coloridos monocromáticos ou dicromáticos como fonte luminosa no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas, com destaque para as espécies da Amazônia, ainda pouco exploradas.

O uso de LEDs vem a ser uma alternativa promissora para a produção de mudas tanto em ambiente *in vitro* quanto em condições externas, em grande escala, principalmente na questão de restrições ambientais, como mudanças climáticas e redução de terras cultivadas. Além de compreender quais comprimentos de ondas seriam ideais para mais espécies de plantas, tanto no seu desenvolvimento quanto na produção de fotoquímicos. Portanto, o cultivo *in vitro* de copaíba sob diferentes comprimentos de onda proporcionados por lâmpadas de LED é uma ideia promissora em termos científicos, trazendo novas perspectivas biotecnológicas e da fisiologia de plantas.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Caracterização botânica e importância da espécie *Copaifera sp.* (Copaíba)

A copaíba (*Copaifera* sp.) é uma essência florestal frequente na Região Amazônica, da Família Leguminosae - Caesalpinioideae. Em sua fase adulta, pode atingir até 36 metros de altura, de copa densa e casca lisa e áspera (Loureiro, 1968). Possui grande importância econômica e terapêutica por produzir óleo-resina e óleo essencial que podem ser utilizados como matérias-primas para fabricação de vernizes, fixador, perfumes, lacas, tintas, combustível e como anti-inflamatório, anticancerígeno, cicatrizante e infecções tetânicas. Sua madeira pode também ser utilizada para construção civil e fabricação de carvão. Na Amazônia, devido as suas características químicas e medicinais, vem sendo utilizada pelas populações como medicamento para várias doenças.

A *Copaifera spp.* é um gênero que possui uma grande variedade de espécies pertencentes ao grupo. Ainda não se sabe o número exato já que muitos são os sinônimos botânicos (Sérgio et al., 2002). O gênero tem 106 nomes e variedades específicos e destes, 49 são considerados válidos, dois nomes são mal aplicados, 49 são sinônimos e seis não são resolvidos. Apenas dezesseis destas espécies podem ser encontradas no Brasil. Quanto aos nomes populares, as plantas do gênero *Copaifera* são conhecidas no Brasil como “copaíba”, “copaibeira”, “copaífera”, “pau-de-óleo”, “palo-de-bálsamo”, “aceite”, “copayer” e “cupa-yba” (Arruda et al., 2019).

O Brasil está entre os países que mais devastam o meio ambiente e seus recursos naturais. Situa-se também entre os países com maior diversidade de espécies do mundo. Essas características conferem a espécie copaíba um potencial econômico já que pode ser utilizada na construção civil, confecção de móveis e cabos de ferramentas. Mas a exploração do seu potencial mais viável é no fornecimento do óleo resina de copaíba, um líquido transparente e terapêutico que é extraído por meio de furos no tronco da árvore até atingir o cerne (Lorenzi et al., 2002).

Do ponto de vista fitoterápico o desafio é padronizar a composição química pois a quantidade de compostos varia de uma espécie para outra ou até mesmo de indivíduos da mesma espécie. Em relação ao uso seguro de *Copaifera spp.*, conclui-se que em doses terapêuticas, a maioria das oleorresinas não apresentam efeitos citotóxicos em células animais normais (Arruda et al., 2019). No entanto, para garantir o uso seguro dessas oleorresinas, outros estudos devem ser realizados.

### **Uso de LEDs na propagação *in vitro* de plantas**

O uso de LEDs como fonte luminosa na propagação *in vitro* tem se mostrado um importante avanço para melhorias no desenvolvimento da plântula como aumento do número e do comprimento de brotações. Sergio et al. (2017) testaram em seu trabalho LEDs coloridos (verdes, azuis e vermelhos) como fonte de luz alternativa às lâmpadas fluorescentes na multiplicação *in vitro* de três cultivares de bananeira e concluíram que os LEDs contribuíram para o desenvolvimento das brotações e que o comprimento destas foi influenciado pela cultivar e pelo tipo de luz. Outros trabalhos envolvendo LEDs e cultura de tecidos demonstram a importância do uso dessa tecnologia como fonte alternativa de luz para complementar e até substituir as comuns lâmpadas fluorescentes, acarretando em importantes modificações morfofisiológicas de acordo com a luz e a espécie utilizada, ressaltando que são necessários mais testes e avaliações para verificar a eficácia dos LEDs na multiplicação *in vitro* com demais espécies.

Outros resultados interessantes também podem ser encontrados para plantas *in vitro* sob LEDs coloridos, demonstrando ainda que a combinação de diferentes lâmpadas pode ter efeito positivo sobre determinadas espécies. Além dos resultados já obtidos nas pesquisas existentes, os LEDs podem também exercer um importante papel na produção dos óleos essenciais (ou outros metabólitos secundários), que determinam o potencial medicinal da copaíba. São poucos os trabalhos no Brasil relacionando a produção de óleos com uso de LEDs coloridos, recentemente Chaves et al. (2020) estudando *Lippia alba* cultivada *in vitro* destacaram que embora a qualidade luminosa não alterou a concentração do composto majoritário, eucaliptol, foi possível a obtenção deste composto *in vitro*, possibilitando uma produção alternativa, rápida e prática do composto. Alvarenga et al. (2015) submeteram uma espécie medicinal (*Achillea millefolium* L.) a diferentes intensidades luminosas utilizando LEDs azuis, vermelhos e verdes. Os autores observaram que além dos LEDs proporcionarem maior acúmulo de matéria seca, número de raízes e porcentagem de enraizamento, alteraram também a quantidade e composição dos compostos voláteis, com variação de acordo com intensidade e qualidade da luz, afirmando por fim que é possível ajustar a luz ambiente para produzir compostos de interesse. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho realizado por Batista et al. (2016) que utilizaram plantas do gênero *Lippia* submetidas a diferentes tipos de luz (lâmpada fluorescente, LEDs azuis e vermelhos) durante o cultivo *in vitro*, tendo como resultados que a composição dos compostos voláteis variou com a qualidade de luz e quimiotipo. Outro estudo com planta medicinal, realizado por Cioć e colaboradores (2018), determinou a influência de diferentes LEDs (azul, vermelho e azul + vermelho) no crescimento e teor de metabólitos secundários *in vitro* de

*Myrtus communis* L. Os autores verificaram que a luz vermelha estimulou a multiplicação e altura da parte aérea, assim como gerou um aumento nas concentrações de polifenóis antioxidantes. Assim, é interessante avaliar os efeitos dos LEDs em todas essas variáveis relacionadas diretamente com o metabolismo secundário. Assim a quantidade e composição dos compostos voláteis variaram com a intensidade e qualidade da luz, sendo que esta pode ser manipulada para produção de compostos de interesse de diversas espécies.

Como o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* são regulados pela relação qualidade-quantidade-duração das luzes de LEDs, neste estudo com plantas de copaíba *in vitro* espera-se que ocorra uma alteração significativa, já que estes estão relacionados diretamente com a luz e sua qualidade. O processo de fotossíntese é fortemente influenciado pelas cores vermelho (610-760nm), azul (450-500nm) e pela combinação vermelho + azul de LEDs, já que são as principais fontes de energia para assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> nas plantas (Batista et al., 2018). Dessa forma também deverão ser estudadas as diferenças nos resultados em relação ao crescimento das plantas sob os diferentes tratamentos, visto que a luz azul possui um papel crucial nas relações hídricas e trocas gasosas e, conseqüentemente, no crescimento e produção vegetal, exercendo uma influência coordenada nos plastídios para o desenvolvimento de cloroplastos e a síntese de clorofila.

### **Micropropagação**

A micropropagação vem se destacando como técnica de grande impacto por sua elevada praticidade e engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da planta. Em espécies da Amazônia é bastante utilizada, pois essa ferramenta biotecnológica permite minimizar problemas comumente encontrados nessas espécies como a dificuldade de germinação e a dificuldade de armazenamento de sementes. Além de promover a produção de mudas em larga escala, complementar bancos de germoplasma e facilitar as trocas de materiais genéticos (Pinhal et al., 2011). Apesar disso, o nível de conhecimento sobre essa técnica em espécies nativas da Amazônia ainda é incipiente.

Os vários tipos de respostas morfogênicas *in vitro* apresentadas por diferentes espécies fazem com que seja necessário o estabelecimento de condições padronizadas de cultivo para cada uma delas e para seus genótipos e tipos de explantes. Portanto, a escolha adequada do meio nutritivo e a padronização das condições de cultivo constituem etapas relevantes no processo de estabelecimento *in vitro* das plantas. Existe ainda um longo caminho a ser percorrido para se estabelecer o método eficiente de micropropagação envolvendo espécies da Amazônia.

Os LEDs podem ter grande influência sobre o crescimento, desenvolvimento e produção

de metabólitos secundários das plantas no cultivo *in vitro*, assim como podem ser um potencial na maximização de produção de óleo essencial da espécie em questão, copaíba. Pouco se sabe sobre o comportamento das plantas nativas da Amazônia expostas a diferentes fontes luminosas. Portanto, é importante que se avaliem os efeitos de possíveis combinações de LED no porte das mudas, no número de brotações e em possíveis alterações morfológicas. Diante disto, objetiva-se verificar fisiologicamente a eficiência do uso de diferentes LEDs coloridos como fonte luminosa na propagação *in vitro* de copaíba com intuito de intensificar a produção de compostos bioativos e assim contribuir para a propagação em larga escala da espécie para fins biotecnológicos.

## **METODOLOGIA**

### **Obtenção do material vegetal**

As sementes de copaíba foram obtidas comercialmente pela empresa Germiverde sementes LTDA.

### **Beneficiamento dos frutos e sementes**

As sementes foram beneficiadas no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia Vegetal, do Departamento de Biotecnologia, Campus Dom Bosco, UFSJ. As sementes foram selecionadas brevemente, onde foram triados e escolhidos apenas as sementes que não possuíssem danos mecânicos e ausência de incidências de pragas e doenças. Após, as sementes foram escarificadas mecanicamente, sendo lixadas até a exposição dos cotilédones. Posteriormente foram desinfestadas em álcool 70% por 5 min e após, em solução de hipoclorito de sódio a 2%, e lavadas em água destilada, sendo, em seguida, secas em bancadas em temperatura ambiente.

### **Germinação *in vitro* de sementes de copaíba**

As sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% por um minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2% de cloro ativo por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada e autoclavada por três vezes. Foram testados os meios de cultura WPM sólido (Lloyd e MCCown, 1980) e WPM líquido associado ao substrato vermiculita, na proporção 1/3 (10g de vermiculita para 30 mL de WPM) (Miranda, 2022), com 15 sementes cada tratamento, suplementados com 30,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificados com ágar 0,7%. O pH corrigido para 5,7 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C ± 2°C e intensidade luminosa fornecidas por diferentes lâmpadas LEDs: 450–500nm/ 138,66 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (LED azul), 149,96 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (LEDs vermelho + azul) e 48,15 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (LED branco – tratamento controle). As lâmpadas LEDs foram obtidas comercialmente da empresa LEDS-UP. A avaliação da porcentagem de sementes foi realizada após 30 dias.

### **Organogênese *in vitro*: Efeito do BAP na indução de brotações**

Plântulas de copaíba obtidas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes, após 30 dias de germinadas. Segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; e 1,5 mg L<sup>-1</sup>), com 10 repetições por tratamento. Os meios foram suplementados com 30,0 g L<sup>-1</sup>de sacarose e 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C e pressão de 1,0 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os frascos foram vedados com tampas e filmes plásticos e mantidos



em sala de crescimento, a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , irradiância de fótons de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa fornecida por lâmpadas LED com diferentes comprimentos de onda de acordo com os tratamentos.

### **Organogênese *in vitro*: Calogênese**

Explantos foliares das plântulas germinadas *in vitro* foram utilizadas para o processo de calogênese. Os explantes foram inoculados em meio WPM suplementado com 1,0 + 1,0; 1,0 + 2,0; 1,5 + 1,5 e 1,5 + 3,0  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D + BAP, além de sacarose a 3%, ágar a 0,7% e pH ajustado para 5,8, sendo 15 repetições por tratamento. A cultura foi mantida durante 30 dias no escuro, sob temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C}$ .

### **Aclimatização das plantas**

Plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro* após 30 dias foram transferidas para o substrato comercial. Após 60 dias de aclimatizadas, foram calculadas a porcentagem de sobrevivência das plântulas após aclimatização.

### **Procedimento estatístico**

Devido as altas taxas de contaminações apresentadas em todas as etapas do trabalho, o procedimento estatístico realizado foi o cálculo da porcentagem dos resultados obtidos.

## RESULTADOS

### GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE COPAÍBA

As sementes de copaíba foram embebidas em água destilada e autoclavada por 24 horas para retirada do arilo (Figura 1A) e, em seguida, escarificadas em lixa nº 100 para a superação da dormência tegumentar (Figura 1B).

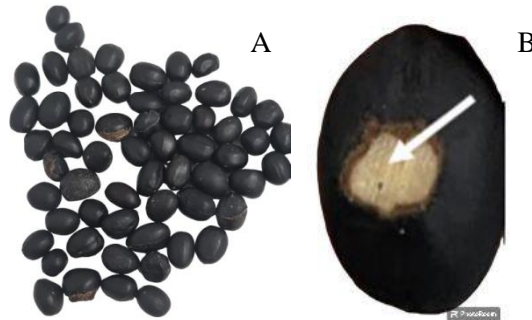


Figura 1. Sementes de copaíba intactas (A) e escarificadas (B) após etapa de escarificação mecânica. Seta indica o cotilédone exposto após o processo de escarificação mecânica.

Após o beneficiamento, as sementes foram submetidas aos tratamentos com diferentes níveis de irradiância (LEDs) e inoculadas em meio WPM sólido e meio WPM líquido + vermiculita. Nas Figuras 2A e 2B são visualizadas as sementes inoculadas nos diferentes tratamentos. Após 30 dias, foi avaliada a porcentagem de sementes germinadas no substrato WPM+vermiculita e verificou-se 80% das sementes germinadas no LED vermelho + azul, 70% de germinação no LED azul e 70% de germinação no LED branca.

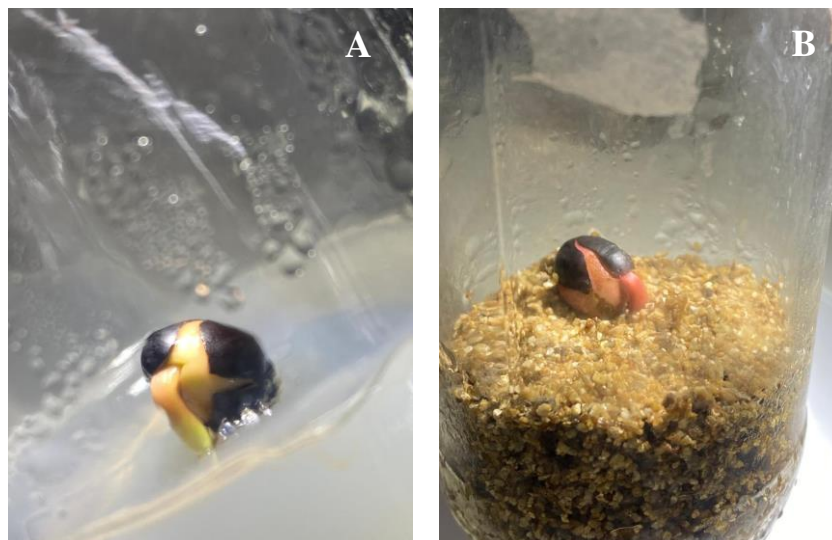


Figura 2. Semente de copaíba inoculadas em meio de cultura WPM sólido (A) e WPM líquido+vermiculita (B).

Quanto a germinação *in vitro* de sementes de copaíba foram observados uma elevada taxa de contaminação (90%) nas sementes germinadas no meio de cultura WPM sólido (Figura 3), não sendo observada contaminação nas sementes inoculadas em WPM líquido+vermiculita.



Figura 3. Semente de copaíba inoculadas em meio de cultura WPM sólido, seta indica contaminação fúngica.

Nas figuras 4A e 4B pode-se visualizar o aspecto geral da plântulas formadas quando as sementes foram submetidas germinadas no LED vermelho+azul, após 30 dias da protusão radicular.

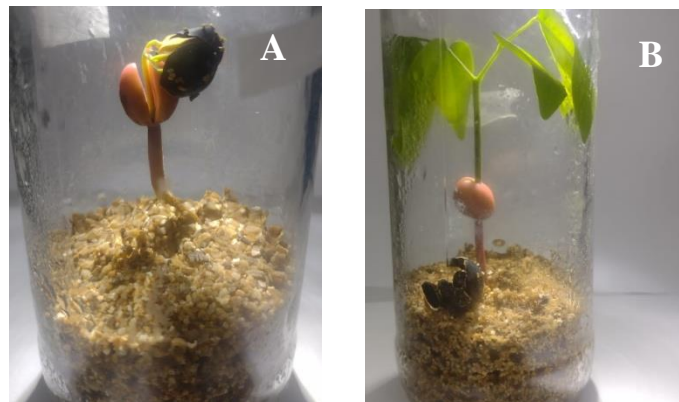


Figura 4. Aspecto geral da formação de plântulas de copaíba em substrato de vermiculita + WPM, após 30 dias de inoculadas no LED vermelho + azul.

### **ORGANOGENESE IN VITRO: EFEITO DO BAP NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES**

Segmentos nodais de copaíba, obtidas de plântulas germinadas *in vitro*, foram inoculados em meio WPM com BAP nas concentrações de 0,0; 1,0; e 1,5 mg L<sup>-1</sup> e submetidas à lâmpadas LED branco, LED vermelho + azul e LED azul. Observou-se uma alta taxa de contaminação (97,5%) dos explantes inoculados (Figuras 5A e 5B). Quanto à formação de

brotação verificou-se 20% brotações no tratamento de 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e LED vermelho + azul; 30% brotações no tratamento 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e LED branco e 10% brotação no tratamento 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP no LED Branco (Figuras 6A e 6B).

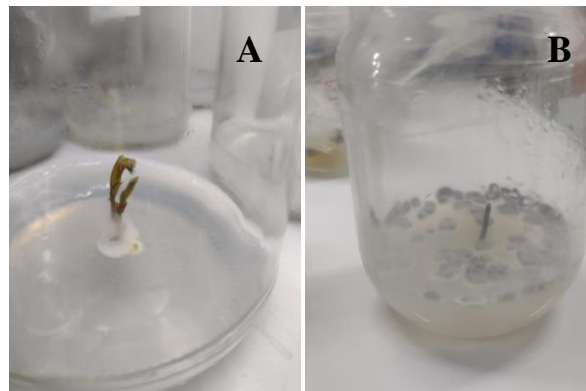


Figura 5. Explantes de segmentos nodais copaiba contaminados por fungos.

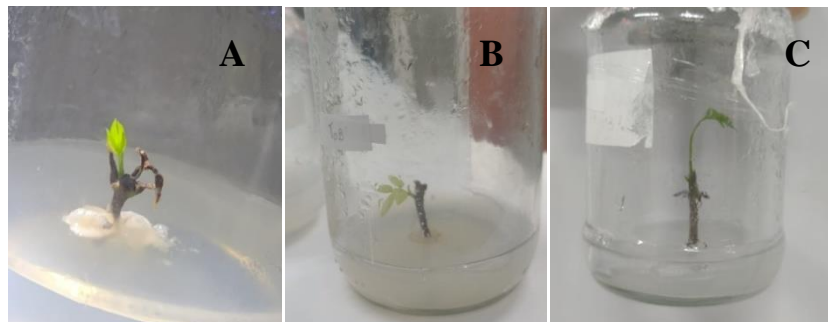


Figura 6. Indução de brotação em explantes nodais de copaiba: (A) 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e LED vermelho + azul; (B) 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e LED branco e (C) e 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e LED branco.

## ACLIMATIZAÇÃO

Com relação a etapa de aclimatização todas as plântulas originadas da germinação *in vitro* de sementes, após 30 dias de inoculação, foram levadas para aclimatização. Foi utilizado substrato comercial e as plantas passaram pelas etapas de aclimatização, utilizando sacos plásticos transparentes, por três semanas, e, posteriormente, mantidas em sala de crescimento, com temperatura, umidade e luminosidade controladas. A Figura 7A ilustra a etapa inicial de aclimatização e na Figura 7B visualiza-se as mudas já aclimatizadas. Na figura 8 pode-se visualizar o aspecto geral das mudas aclimatizada oriundas dos diferentes de tratamentos de LED, com uma taxa de sobrevivência de 82,4%.



Figura 7. Etapas de aclimatização de mudas de copaíba após a germinação *in vitro*.

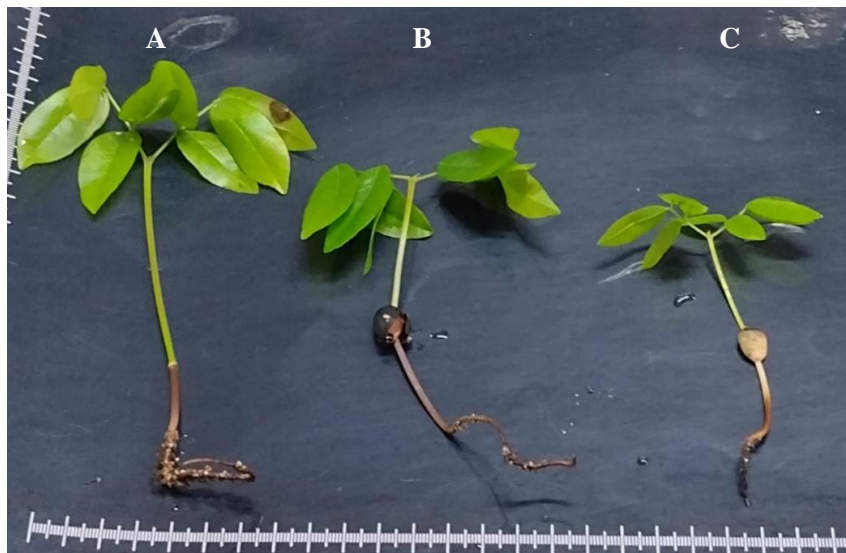


Figura 8. Aspecto geral das plantas aclimatizadas de copaíba após 23 dias, (a) LED Branco; (b) LED vermelho+azul; (c) LED azul.

## INDUÇÃO DA CALOGÊNESE

Quanto à etapa de calogênese foram inoculados segmentos foliares oriundas de plântulas de copaíba estabelecidas *in vitro* submetidas aos tratamentos de 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 2,4-D (controle); 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 3,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; sendo realizado 15 repetições de cada tratamento. Todos tratamentos foram realizados com meio WPM com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Após inoculados, foram mantidos em B.O.D. no escuro.

Obteve-se uma alta taxa de contaminação (Figura 9). Após 45 dias, explantes mantidos

no escuro, foram observados formação inicial de calos no tratamento de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D (Figura 10A) e no tratamento  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D (Figura 10B). Nos demais tratamentos não foram observados formação de calos nos explantes (Figura 11). Após 60 dias de inoculados, os calos apresentaram-se oxiadados e com presença de contaminação por fúngica, como mostrado na Figura 12 sendo em seguida, descartados.

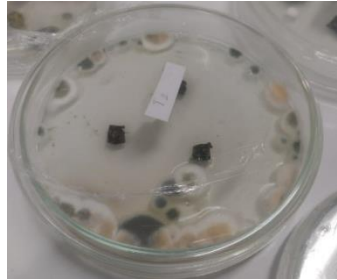


Figura 9. Contaminação em explantes foliares de plântulas de copaíba.

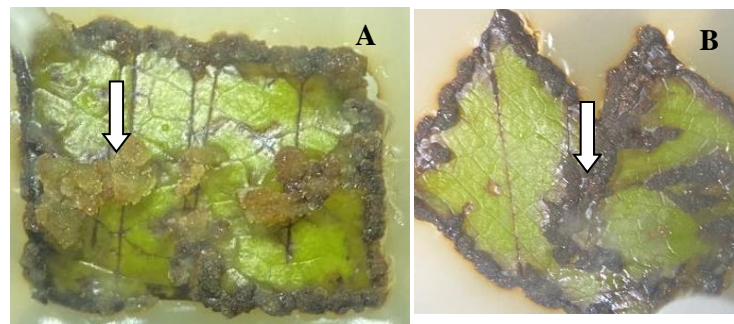


Figura 10. Formação de calos em explantes submetidos ao (A) tratamento T1 ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D) e no (B) tratamento T4 ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D). Setas indicam a formação de calos nos explantes.



Figura 11. Explantes submetidos aos tratamentos de indução de calogênese: A) Tratamento 0, sem presença de fitoreguladores; B) Tratamento com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D; C) Tratamento com  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D.

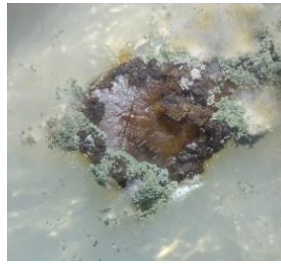


Figura 12. Calos com a presença de fungos após 60 dias dos explantes inoculados, e após 15 dias do surgimento de calos.

## DISCUSSÃO

A micropropagação, que envolve o cultivo dos explantes em um meio nutritivo sob condições assépticas, consiste na seleção e desinfestação dos explantes, seguida da multiplicação e, posteriormente, ocorre a aclimação das plantas em um ambiente *ex vitro* (Dutra et al., 2010). Vários fatores exercem influência sobre o sucesso desse processo, como o tipo de explante, o meio de cultivo, a fonte e a concentração de açúcares e reguladores de crescimento, a taxa de multiplicação, a altura das plantas, a presença e a intensidade de estiolamento, a forma, a cor e o tamanho das folhas, a formação de calos, o desenvolvimento de raízes, como perdas devido à contaminação microbiana e eficiência da aclimação (Navroski et al., 2014). Qualquer desequilíbrio nesses fatores pode levar a alterações morfofisiológicas prejudiciais ao desenvolvimento das plantas (Palma et al., 2011). Dessa maneira, a elevada taxa de contaminação é um desafio na micropropagação, pois pode comprometer a viabilidade da técnica, podendo ocasionar perdas de material (Oliveira et al., 2007). As plantas lenhosas e florestais apresentam grandes taxas de contaminações em meio *in vitro*, sendo consideradas de difícil propagação. Bastos et al. (2008) afirmaram que o estabelecimento *in vitro* de plantas lenhosas frequentemente encontra desafios, principalmente devido à contaminação por microrganismos. Neste trabalho, observou-se nas etapas de indução de brotação e calogênese, alta taxa de contaminação, dificultando o processo, podendo considerar a copaíba como inviável o estabelecimento *in vitro* por meio de ápices, folhas e pecíolos (Bastos, 2007).

Ao considerar a presença de fungos endógenos em plantas lenhosas, percebe-se que a espécie Copaíba apresenta uma alta taxa de contaminação em meios de culturas. A assepsia dos explantes não expõe os microrganismos endógenos aos agentes desinfetantes, apesar da maioria deles não ser patogênica. No entanto, esses microrganismos podem crescer rapidamente no meio de cultura, competindo com os explantes por nutrientes, o que prejudica seu desenvolvimento e crescimento (Yamazaki et al., 1995).

A germinação de sementes *in vitro* se destaca na cultura de tecidos, uma vez que a partir da germinação é possível obter explantes e mudas assépticas. 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 vermiculita, como suporte físico alternativo ao ágar e ambiente de luz artificial, promove maior crescimento *in vitro* de brotos de abacaxizeiro (Braga et al., 2011), sendo coerente com o demonstrado nesse estudo com copaíba.

Os reguladores de crescimento, especialmente as citocininas em conjunto com as auxinas, são os principais fatores que controlam a morfogênese *in vitro*. Esses reguladores promovem alterações na taxa metabólica, atividade enzimática, indução e formação de órgãos, quebra de dominância apical, mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos, e aumento da longevidade de tecidos e órgãos, sendo essenciais para as etapas de brotação e calogênese (Oliveira et al., 2007). O sucesso na brotação *in vitro* é dado pelas concentrações certas de fitohormônios já encontrados nas plantas e os artificiais. Soares et al. (2007) ao utilizarem a mangabeira obteve melhores resultados na indução de brotação nas concentrações 1,0 mg L<sup>-1</sup> e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Já as brotações obtidas nesse estudo, com a copaíba, demonstram que não é necessária a utilização de BAP para o surgimento de brotos.

A formação de calos é gerada, também, por meio das concentrações de citocininas e auxinas, a espécie de *Copaifera* spp. utilizando explantes foliares demonstra que os melhores resultados são atribuídos por pequenas concentrações de BAP (1,0 mg L<sup>-1</sup>), e 2,4-D (1,0 mg L<sup>-1</sup>) em meio WPM. Assim como Zanotti, et al. (2012), que obtiveram para a espécie de copaíba, as maiores frequências de calos foram obtidas quando aplicados 3,375 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,105 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D em meio MS.



## CONCLUSÃO

O uso da vermiculita associado ao meio WPM líquido favoreceu a germinação de sementes de copaíba, diminuindo a taxa de contaminação. Ao realizar a escarificação mecânica do tegumento das sementes, é possível aumentar significativamente a porcentagem de germinação, o que, por sua vez, favorece o estabelecimento *in vitro* da espécie.

Conclui-se que, neste trabalho, o uso de diferentes LEDs não alteram de forma significativa a indução de brotação. A indução de calos foram melhores expressos na concentração  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4D.

A contaminação é um dos principais desafios enfrentados no cultivo *in vitro* de plantas em ambiente laboratorial. Para superar essa dificuldade, sugere-se que sejam aprofundados estudos sobre os processos de desinfestação. Os obstáculos encontrados destacam a importância de pesquisas que buscam o desenvolvimento de protocolos eficientes para o estabelecimento do cultivo *in vitro* dessa espécie em trabalhos futuros.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, Ivan *et al.* In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [S. l.], v. 122, p. 299–308, 7 abr. 2015. DOI 10.1007/s11240-015-0766-7
- ARRUDA, Caroline *et al.* Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus-A review. **Biomed Pharmacother**, [S. l.], v. 109, p. 1-20, jan. 2019. DOI 10.1016/j.biopha.2018.10.030.
- BASTOS, Lucimário *et al.* Cultivo in vitro de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, [S. l.], v. 5, p. 1122–1124, 14 abr. 2008.
- BATISTA, Diego *et al.* Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 52, n. 3, p. 276–282, 2 maio 2016. DOI 10.1007/s11627-016-9761-x
- BATISTA, Diego *et al.* Light quality in plant tissue culture: does it matter?. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, [S. l.], v. 54, p. 195–215, 30 abr. 2018. DOI 10.1007/s11627-018-9902-5.
- BRAGA, Franciane; PASQUAL, Moacir; CASTRO, Evaristo; RAFAEL, Gabriel. Características Morfofisiológicas de abacaxizeiro ‘gomo de mel’ enraizado *in vitro* sob luz natural e substrato vermiculita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 551-557, 25 jul. 2011. DOI 10.1590/S0100-29452011000200027
- CIOĆ, Monika. *et al.* LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 3, p. 433–447, 2018. DOI 10.1007/s11240-017-1340-2
- CHAVES, Marcela *et al.* Influence of colorful light-emitting diodes on growth, biochemistry, and production of volatile organic compounds *in vitro* of *Lippia filifolia* (Verbenaceae). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 212, nov. 2020. DOI 10.1016/j.jphotobiol.2020.112040
- CLEMENTE, Charles. 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, [S. l.], v. 53, p. 188–202, abr. 1999. DOI 10.1007/s11627-018-9902-5.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [S. l.], n. 58, p. 49, 2010.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendrops*. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416, 1980.
- LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum, 2002. v. 1, 4a ed., 368 p.
- LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F. da. **Catálogo das madeiras da Amazônia**. Belém: SUDAM, 1968. v. 1. 433 p.

MIRANDA, Natane Amaral; XAVIER, Aloisio; OTONI, Wagner Campos. Applicability of in vitro clonal hedge in the vegetative propagation of *Eucalyptus urophylla*. **New Forests**, [S. l.], p. 2, 28 nov. 2022. DOI 10.1007/s11056-022-09954-6.

NAVROSKI, Marcio; REINIGER, Lia; ARAÚJO, Maristela; CURTI, Aline; PEREIRA, Mariane. In vitro establishment and multiplication of genotypes of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **CERNE**, [S. l.], p. 139-146, 1 mar. 2014. DOI 10.1590/S0104-77602014000100017

OLIVEIRA, Lenaldo *et al.* Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo in vitro de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, Brasil, v. 29, n. 1, p. 25-30, 26 jun. 2007. DOI 10.1590/S0100-29452007000100008

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [S. l.], v. 33, n. 76, p. 439–453, 2013. DOI 10.4336/2013.pfb.33.76.481

PALMA, Denise; SCHUELTER, Adilson; STEFANELLO, Suzana; FORTES, Andréa. ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E CONTROLE DA HIPERHIDRICIDADE NA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS. **Current Agricultural Science and Technology**, [S. l.], v. 17, p. 174-184, jun. 2011.

PINHAL, H. F.; ANASTACIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011. DOI 10.1590/S0103-84782011005000089

RAMOS, C. A. **A importância das florestas em pé na Amazônia**. IPAM, Amazônia. 2020

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. DOI 10.5433/1679-0359.2012v33n3p1021

SÉRGIO, Paulo. *et al.* Uso de LEDs na multiplicação *in vitro* de três cultivares de bananeira. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 11, n. 2, p. 247–252, 2017.

VEIGA JR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, 25, 273–286, 2002. DOI 10.17584/rcch.2017v11i2.6666.

SOARES, Fernanda *et al.* Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancorniaspeciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 17 set. 2007. DOI 10.1590/S1413-70542007000400016

YAMAZAKI, Takehiro *et al.* Nitrite Reductase from the Magnetotactic Bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*: A Novel Cytochrome cd1 with Fe(II): Nitrite Oxidoreductase Activity. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 233, n. 2, p. 665-671, 1 out. 1995.

ZANOTTI, R. .; SARTOR, F. R.; PÔSSA, K. .; PILON, A. .; FUKUSHIMA, C. . germinação e indução da calogênese in vitro de copaíba . **Enciclopedia Biosfera**, [S. l.], v. 8, n. 15, 2012.