



MICROPROPAGAÇÃO DE COPAÍBA

Propagação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* Desf

Leonardo Gonçalves Noletto

Mestre em Botânica/UnB
Professor Substituto/Depto de Botânica
Universidade de Brasília
leonardonoleto@yahoo.com.br

Conceição Encida dos Santos Silveira

Doutora em Citologia e Fisiologia Vegetal / Paris VI
Professor Adjunto / Depto de Botânica
Universidade de Brasília
cess@unb.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Resumo

Copaifera langsdorffii Desf. (copaíba, copaíba vermelha, pau d'óleo), pertencente à família Leguminosae - Caesalpinioideae, é uma espécie arbórea que ocorre no Bioma Cerrado, muito conhecida por suas propriedades medicinais, como também por suas utilizações madeireiras e ornamentais. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de metodologias para a germinação *in vitro* e micropropagação de copaíba. Sementes e segmentos nodais de ramos de indivíduos adultos de copaíba foram submetidos a diferentes protocolos de desinfestação e cultivo *in vitro*. O fungicida Benomyl não foi eficaz nos tratamentos de desinfestação de sementes, no entanto, foi eficaz para a desinfestação de segmentos nodais de plantas adultas. Os tempos de imersão em hipoclorito de sódio que proporcionaram melhores resultados foram os acima de 15 minutos. Para a germinação *in vitro*, o meio contendo ponte de papel filtro sobre água destilada apresentou o mais alto valor de germinabilidade (75%) em relação aos demais testados. A escarificação mecânica realizada apresentou os mais baixos valores de germinabilidade quando associada aos mais altos tempos de desinfestação, 45,8% e 50% para 45 e 60 minutos, respectivamente. O estabelecimento *in vitro* de explantes de plantas adultas não foi bem sucedido, pois as metodologias utilizadas provocaram o escurecimento e a morte dos

explantes. Na multiplicação *in vitro* utilizando segmentos nodais e ápices de plântulas, o nó cotiledonar proporcionou melhor resposta em relação à gema apical.

O enraizamento foi testado em meio $\frac{1}{4}$ MS desprovido e acrescido de 10% de carvão ativo, e em experimento fatorial (2×3): AIB (0 e 0,1 mg.L⁻¹) e AIA (0; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹), com 10% de carvão ativo. O enraizamento ocorreu em brotos cultivados em meio $\frac{1}{4}$ MS acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de AIA e 0,1 mg.L⁻¹ de AIB + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA. O carvão ativo não favoreceu maior número de brotos enraizados. A maior porcentagem de enraizamento observada foi baixa (16%) e não diferiu significativamente dos outros tratamentos. Todas as plântulas enraizadas foram aclimatadas.

Summary

Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) it is a woody tree specie of the Leguminosae family which has medicinal uses, lumber and ornamental uses. The aim of this work was the establishment of methodologies for the *in vitro* germination and micropropagation. Seeds and nodal segments of branches of adult individuals of copaíba had been submitted the different protocols of disinfection and *in vitro* culture. The Benomyl fungicide was indifferent in the treatments of disinfection of seeds, however, was efficient for the nodal segments disinfections of adult plants. The times of immersion in

sodium hypochlorite that they had provided better results had been above of 15 minutes. For the *in vitro* germination, the medium contend paper bridge filter on distilled water presented the highest value of germination percentage (75%) than the other treatments tested. The mechanical scarification realized presented the lowest values when associated to the highest times of desinfestação, 45.8% and 50% for 45 and 60 minutes, respectively. The *in vitro* establishment of explantes of adult plants was not successful, therefore the used methodologies had provoked the blackout and the death of the explantes. In the *in vitro* multiplication using nodal segments and stem apex of seedlings, the cotyledonary node presented better results than apical apex. Two experiments were tested in ¼ MS medium without and with 10% of active charcoal, and in factorial arrangement experiment (2 x 3): AIB (0 e 0,1 mg.L-1) and AIA (0; 0,1 e 0,5 mg.L-1), added 10% of active charcoal. The rooted plants was better in shoots cultivated in medium ¼ MS which increased 0.5 mg.L-1 of AIA and 0.1 mg.L-1 of AIB and 0.1 mg.L-1 of AIA. The greater rooting percentage observed was low in both treatments (16%) and didn't differ significantly from the other

treatments. The active coarchal did not effective in more number of rooted shoots. All rooted plants had been acclimatized.

Introdução

A copaíba vermelha (*Copaifera langsdorffii* Desf.) é uma espécie da família Leguminosae - Caesalpinioideae de ocorrência natural principalmente em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, sendo também encontrada em outros estados brasileiros abrangidos pelo Bioma Cerrado (Lorenzi, 1992; Almeida *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2002).

Esta espécie possui utilizações madeireira, medicinal e ornamental (Almeida *et al.*, 1998). A madeira é moderadamente pesada e resistente ao ataque de xilófagos, sendo indicada para a construção civil, confecção de móveis, peças torneadas, possuindo também outros usos (Lorenzi, 1992; Paula & Alves, 1997). Medicinalmente é utilizada devido ao óleo extraído de seu fuste, antiinflamatório, cicatrizante e para problemas de pele (Lorenzi, 2002; Veiga Jr. & Pinto, 2002).

Além disso, possui potencial para a arborização urbana (Machado *et al.*, 1991; Lorenzi, 1992). É recomendada para paisagismo urbano devido à beleza da forma e elegância

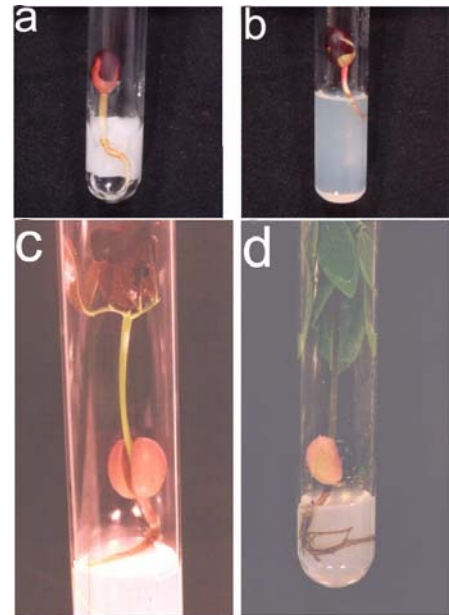


Figura 1: Desenvolvimento pós-seminal *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* Desf. a) Germinação em ponte de papel filtro aos 15 dias da inoculação; b) Germinação em ágar - água aos 15 dias da inoculação; c) Plântula com os folíolos avermelhados aos 22 dias da inoculação; d) Plântula com os folíolos verdes aos 30 dias da inoculação.

da copa, que mostra tonalidade vermelho-vináceo em função das folhas recém-brotadas após a frutificação. É recomendada para arborização de estacionamentos, pois a árvore fica desfolhada apenas parcialmente por um curto período de tempo (Machado *et al.*, 1991; Lorenzi, 1992), além

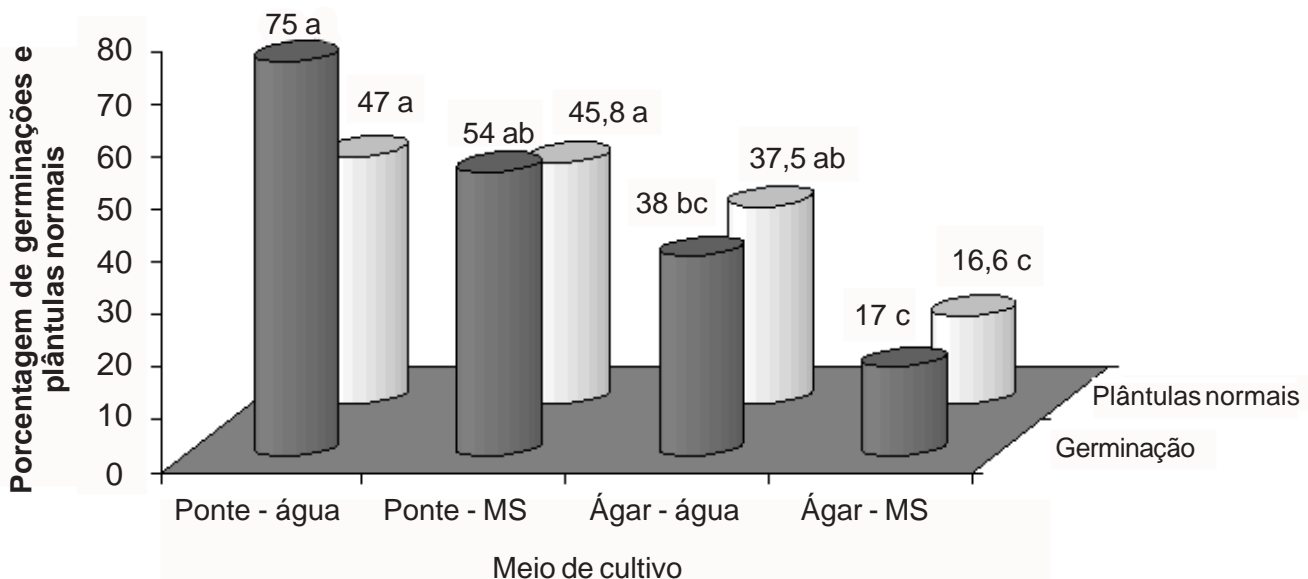


Figura 2: Efeito dos meios de cultivo sobre o percentual de germinação e desenvolvimento de plântulas *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* aos 33 dias. Médias com letras iguais não diferem entre si significativamente (Tukey, p < 0,05).

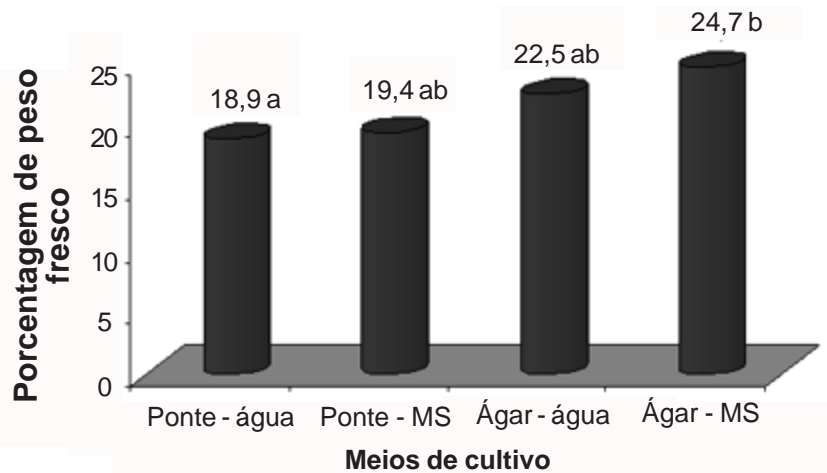


Figura 3: Efeito dos meios de cultivo sobre a massa seca (expresso em porcentagem de massa fresca) de plântulas de *Copaiifera langsdorffii* aos 22 dias. Médias com letras iguais não diferem entre si significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

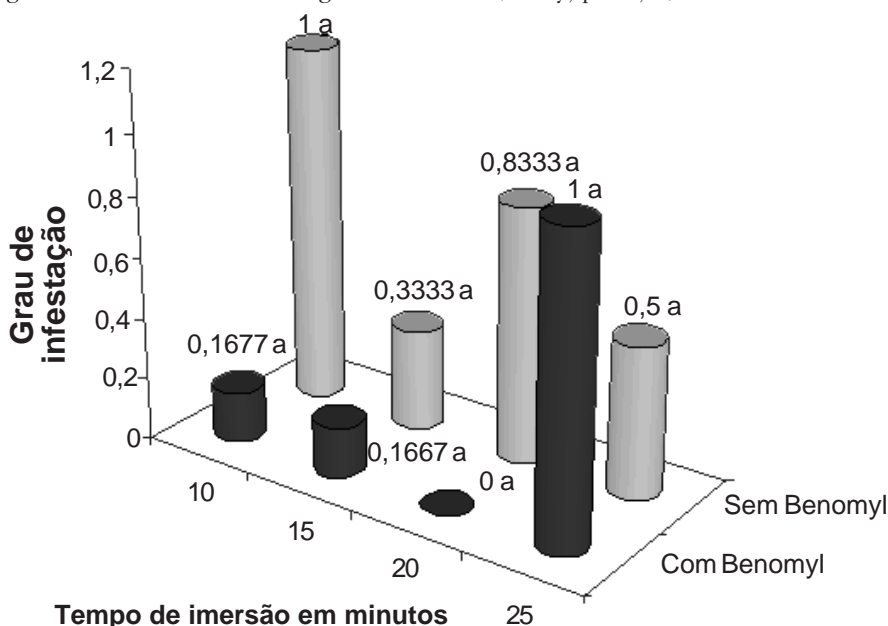


Figura 4: Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio e do Benomyl sobre a infestação de sementes de *Copaiifera langsdorffii*, no 15º dia da inoculação (Tukey, $p < 0,05$).

de apresentar frutos leves e pequenos e sistema radicular profundo (Machado *et al.*, 1992).

É uma planta climáxica na cadeia de sucessão ecológica (Bezerra *et al.*, 2002), semidecídua, heliófita, seletiva xerófila e característica das regiões de transição de cerrado para floresta latifoliada semidecídua (Lorenzi, 1992). Produz todo ano uma grande quantidade de sementes, amplamente disseminadas por pássaros e roedores, que comem o arilo envolvente (Lorenzi, 1992; Almeida *et al.*, 1998).

Desta forma, em função da sua importância ecológica e econômica é uma espécie prioritária nas ações

relativas à conservação *in situ* e *in vitro* da espécie (Vieira *et al.*, 2002). Além disso, é uma espécie que se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção (Siqueira & Nogueira, 1992).

O conhecimento de metodologias de propagação é, portanto, fundamental para a preservação da espécie. De acordo com a literatura, as sementes possuem elevada germinabilidade quando submetidas à escarificação mecânica (Machado *et al.*, 1992) ou química (Bezerra *et al.*, 2002). Entretanto, a reprodução sexuada apresenta algumas limitações: as sementes são produzidas durante um curto período, de julho a setem-

bro (Lorenzi *et al.*, 1992; Almeida *et al.*, 1998) e mostram queda de viabilidade e diminuição da velocidade de germinação, ao longo do tempo de armazenamento, em temperatura ambiente (Santos Jr. & Felipe, 1996).

Assim, apesar da literatura classificar a semente desta espécie como ortodoxa (Eira *et al.*, 1992), a perda de viabilidade ao longo do tempo indica que as sementes apresentam um certo grau de recalcitrância. Portanto, a semente de copaíba apresentaria características intermediárias, entre ortodoxa e recalcitrante, tal como observado em outras espécies, como por exemplo em *Eugenia dysenterica* (Andrade *et al.*, 2003).

Outra limitação da reprodução sexuada é o longo período para a obtenção de genótipos com características agrônomicas desejáveis, em programas de melhoramento genético.

Essas características da espécie juntamente à autoincompatibilidade e ausência de apomixia (Freitas & Oliveira, 2002; Oliveira *et al.*, 2002), atestam a necessidade de ampliar o conhecimento sobre a propagação de *C. langsdorffii*.

Dentro desse contexto, a propagação *in vitro* é uma alternativa a ser considerada para a produção em larga escala de mudas de plantas nativas do Cerrado (Melo *et al.*, 1998). Entre as técnicas que poderiam ser utilizadas, podem-se citar a germinação de sementes *in vitro* e a micropropagação a partir de segmentos nodais e ápices caulinares de plântulas ou indivíduos adultos.

Em plantas lenhosas, a utilização de explantes provenientes de plantas adultas é vantajosa, uma vez que permite a reprodução de genótipos conhecidos (Bhojwani & Razdan, 1983). Entretanto, esses explantes apresentam uma maior dificuldade para o estabelecimento *in vitro*, pois estão sujeitos à infecção interna e externa por microrganismos difíceis de eliminar (Melo *et al.*, 1998).

Além disso, explantes provenientes de plantas adultas apresentam, em geral, tecidos com baixa capacidade morfogênica muito co-

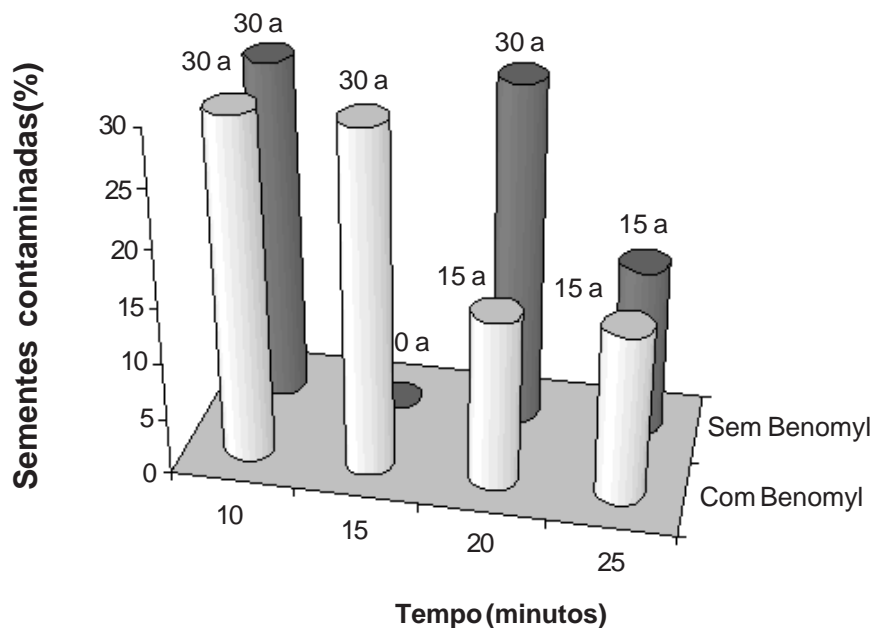


Figura 5: Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio e do Benomyl sobre o número de sementes contaminadas de *Copaifera langsdorffii*, no 15º dia da inoculação (Tukey, $p < 0,05$).

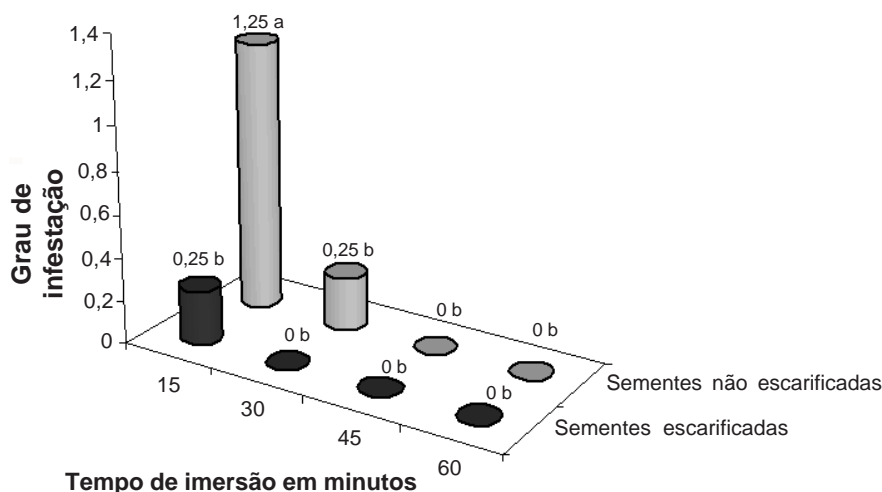


Figura 6: Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio e da escarificação mecânica sobre a germinação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii*, no 15º dia da inoculação. Médias com letras iguais não diferem entre si significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

num em leguminosas arbóreas (Trigiano *et al.*, 1992). Para serem reativados são utilizadas técnicas de rejuvenescimento (Huang *et al.*, 1990), como a microenxertia (Paz & Pasqual, 1998). Face ao exposto, sob o ponto de vista fisiológico e experimental, para estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* para espécies lenhosas é mais viável tecnicamente trabalhar com plântulas germinadas *in vitro*.

Nessas condições os explantes se encontram em estágio juvenil, possuindo maior capacidade de cres-

cimento e resposta dos tecidos. Desta forma é possível conduzir inúmeros experimentos testando fitohormônios e fitoreguladores (Grattapaglia & Machado, 1998; Pradhan *et al.*, 1998).

A germinação de sementes *in vitro* permite, freqüentemente, uma maior germinabilidade das sementes do que em viveiros, provavelmente porque estas são mais adequadas aos processos de germinação e desenvolvimento inicial da plântula. Esta técnica também é necessária para a produção de porta-enxertos utiliza-

dos na microenxertia (Paz & Pasqual, 1998; Prakash *et al.*, 1999; Pio *et al.*, 2001).

Dentro desse contexto, este trabalho tem como objetivos determinar as condições mais favoráveis para a germinação *in vitro* e estabelecer um protocolo de micropropagação a partir de segmentos nodais e ápices caulinares, de plântulas e plantas adultas, testando diferentes concentrações de hormônios e reguladores de crescimento.

Material e métodos

1 - Coleta, processamento pós-coleta e armazenamento

Sementes e ramos jovens e adultos de *Copaifera langsdorffii* Desf. foram coletadas em agosto de 2002, de matrizes localizadas em Brasília-DF, na margem da Avenida das Nações e próxima à Procuradoria Geral da República (15º 48,4' S; 47º 51,0' W). Exsiccatas foram depositadas no herbário da Universidade de Brasília sob o número de tombo UB12602. Após a coleta, as sementes sadias foram armazenadas em recipientes plásticos perfurados, mantendo seus arilos (Almeida *et al.*, 1998), durante 2 meses a 4 °C, até o momento de sua utilização. Sementes atrofiadas, atacadas por insetos ou que possuíam alguma injúria foram eliminadas, juntamente com outras impurezas.

2 - Germinação *in vitro*

2.1 - Experimento 1: Influência do meio de cultivo na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas.

As sementes foram escarificadas mecanicamente, através de punção na testa com bisturi, a fim de quebrar a dormência tegumentar (Almeida *et al.*, 1998). Em seguida, as sementes foram previamente submetidas a dois diferentes procedimentos de desinfestação em câmara de fluxo laminar:

Procedimento 1

- a) Imersão em solução alcoólica a 70%, durante 1 minuto;
- b) Imersão em hipoclorito de

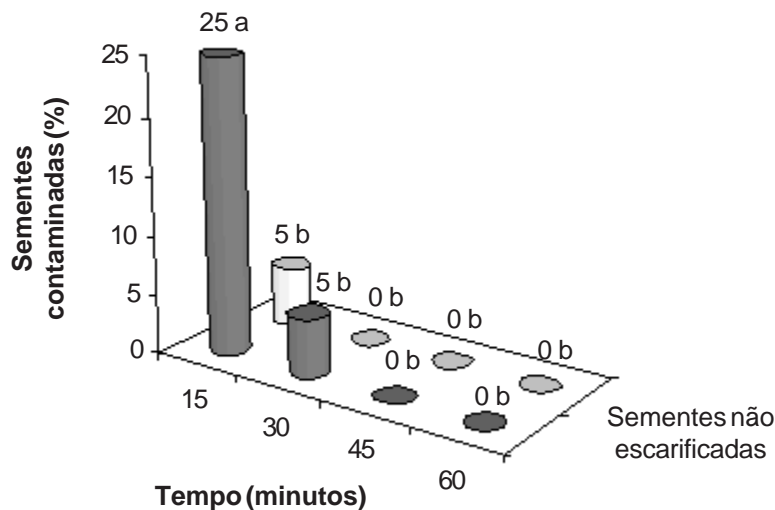


Figura 7: Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio e da escarificação mecânica sobre o número *in vitro* de *Copaifera langsdorffii*, no 15º dia da inoculação. Médias com letras iguais não diferem entre si significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

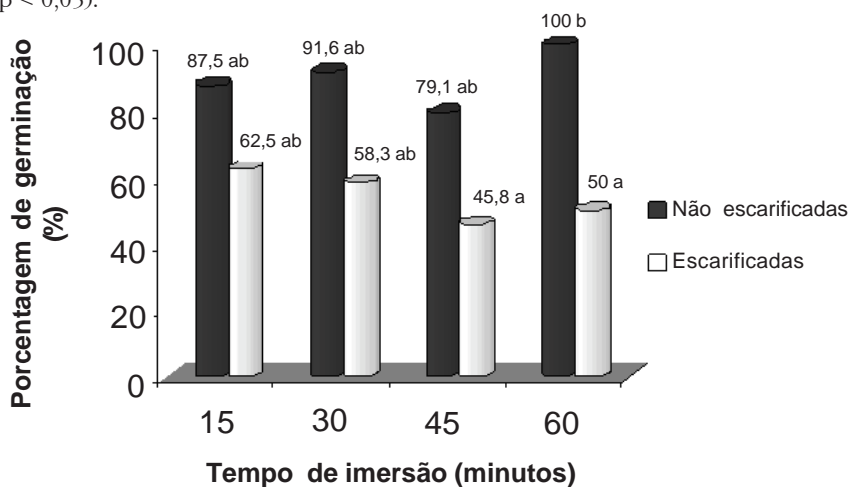


Figura 8: Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) na porcentagem de germinação de *Copaifera langsdorffii* aos 53 dias da inoculação. Médias com letras iguais não diferem entre si significativamente (LSD, $p < 0,05$).

sódio a 2,5% de cloro ativo, durante 10, 15, 20 e 25 minutos;

c) Três enxágües em água destilada e autoclavada.

Procedimento 2

a) Imersão em solução alcoólica a 70% contendo Benomyl a 20 g.L⁻¹, durante 3 horas;

b) Imersão em solução alcoólica a 70%, durante 1 minuto;

c) Imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo, durante 10, 15, 20 e 25 minutos;

d) Três enxágües em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio por

tubo, e com lâmpadas fluorescentes (luz do dia) de 40W, e cultivadas em diferentes condições de cultivo *in vitro*: em meio água-ágar a 7 g.L⁻¹; em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sem sacarose e gelificado com 6 g.L⁻¹ de agar; em ponte de papel filtro utilizando água destilada deionizada como meio, e em ponte de papel filtro sobre meio MS líquido e sem sacarose. Os tubos foram fechados com tampas plásticas e vedados com filme de PVC. Foram observados o número de sementes contaminadas e a intensidade de infestação, atribuindo-se valor de 0 a 5 para qualificar a infestação. Nessas condições, observou-se diariamente a germinação das sementes e o número de plântulas formadas além da maté-

ria seca média das plântulas normais após todas terem se desenvolvido. Considerou-se a semente como germinada após a emissão do hipocótilo. Para a avaliação dos procedimentos de desinfestação foram realizadas 6 repetições com 1 semente em cada, atribuindo-se o valor de 0 a 5 para qualificar a intensidade de infestação. As plântulas consideradas normais e formadas foram aquelas que possuíam hipocótilo, epicótilo e eófilos bem expandidos e verdes. Todas as manipulações foram realizadas sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar horizontal. As culturas foram mantidas em sala de crescimento.

2.2 - Experimento 2: Influência da escarificação e do tempo de desinfestação na germinação *in vitro*

Sementes previamente escarificadas, da mesma forma que foi realizada no experimento anterior, e um controle sem escarificação foram desinfestados em banhos sucessivos de álcool 70% (15 min.), hipoclorito de sódio a 2,5% em diferentes períodos (15, 30, 45 e 60 min.) e três banhos de água destilada e autoclavada.

Em seguida as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo ponte de papel de filtro sobre água destilada e autoclavada. O delineamento experimental adotado foi o fatorial (2 x 4) com 4 sementes, contendo 6 sementes em cada repetição. A germinabilidade foi observada diariamente durante o período necessário para que todas as sementes viáveis germinassem. Tal como no experimento anterior, foram observados o número de sementes contaminadas e a intensidade de infestação, atribuindo-se valor de 0 a 5 para qualificar o grau de infestação.

3- Estabelecimento de culturas a partir de segmentos nodais de plantas adultas

Segmentos nodais de ramos jovens e lenhosos de árvores adultas de *C. langsdorffii* foram previamente lavados e submetidos a dois procedimentos de desinfestação em

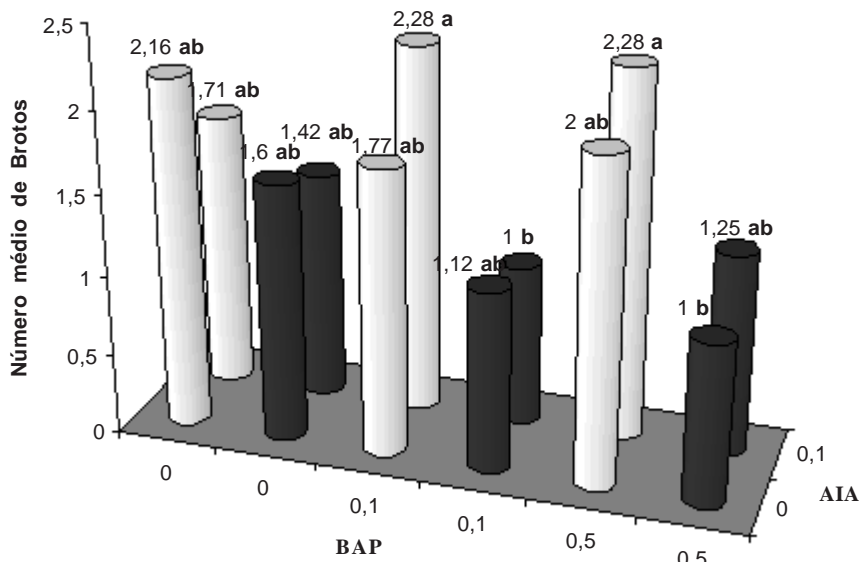


Figura 9: Efeito da Benzilaminopurina (BAP) e do Ácido Indolacético (AIA) sobre o número médio de brotos de *Copaifera langsdorffii* aos 60 dias de cultura. Barras em branco e preto representam os nós cotiledonares e ápices, respectivamente. Médias com letras iguais não diferem entre si significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

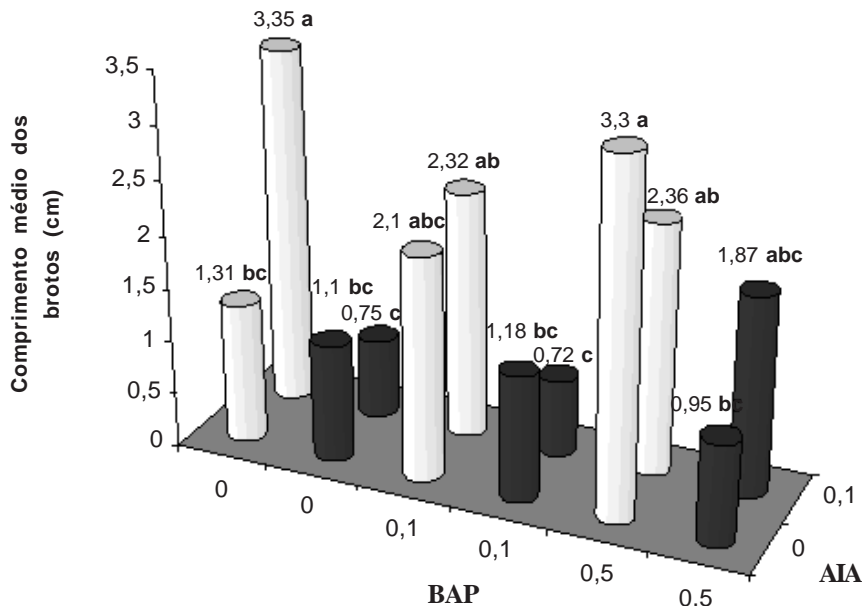


Figura 10: Efeito da Benzilaminopurina (BAP) e do Ácido indolacético (AIA) sobre o comprimento médio dos brotos de *Copaifera langsdorffii* aos 60 dias de cultura. Colunas em branco e preto representam os nós cotiledonares e ápices, respectivamente (Tukey, $p < 0,05$).

câmara de fluxo laminar, através de sucessivas imersões em soluções germicidas. O procedimento 1 consistiu de 1 minuto em álcool 70%, 15 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo e três enxágües em água destilada e autoclavada. O procedimento 2 foi semelhante ao 1 acrescido de um banho em solução de Benomyl (10 g.L⁻¹) durante 30 segundos.

Após a desinfestação, os explantes foram inoculados em meio ½ MS e, após 15 dias, foram observa-

dos a porcentagem de desinfestação e a sobrevivência dos explantes inoculados. Foram inoculados 48 explantes por tratamento de desinfestação.

4 - Multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais e ápices de plântulas

Plântulas obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro* foram seccionadas em explantes nodais cotiledonares e apicais caulinares de

2,0 cm de comprimento. Esses explantes foram inoculados em vidros (60 x 130mm) com 40 mL de meio por vidro, fechados com tampas plásticas e vedados com filme de PVC. As culturas foram mantidas em meio ½ MS com 6% de ágar e 2% de sacarose, com diferentes concentrações de BAP (0; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹) e AIA (0 e 0,1 mg.L⁻¹) formando um delineamento experimental fatorial (2 x 3) com diferentes números de repetições. Contudo, cada tratamento continha o número mínimo de 5 repetições. Aos 60 dias da inoculação, foram avaliados o número de brotações por explante, o tamanho dos brotos, a ocorrência ou não de enraizamento e a presença de calo na região proximal dos explantes. As culturas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições dos experimentos anteriores.

5 - Enraizamento

5.1 - Experimento 1: Efeito do carvão ativo sobre o enraizamento *in vitro*

O enraizamento *in vitro* foi testado utilizando brotações obtidas do experimento de multiplicação. Esses brotos foram inoculados em meio ¼ MS com 6% de ágar e 1% de sacarose na ausência de carvão, e com 10% (p/v) de carvão ativo. Foram realizadas 6 repetições por tratamento com um broto em cada repetição.

5.2 - Experimento 2: Influência do AIB e do AIA no enraizamento *in vitro*

Da mesma forma que o experimento anterior, também foram utilizadas brotações obtidas do experimento de multiplicação. Esses brotos foram inoculados em meio ¼ MS com 6g de ágar, 1g de sacarose e 10g de carvão ativo com diferentes concentrações de AIB (0 e 0,1 mg.L⁻¹) e AIA (0; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹) formando um delineamento experimental fatorial (2 x 3).

6 - Aclimação

A aclimação foi realizada retirando-se as vitroplântulas dos vidros,

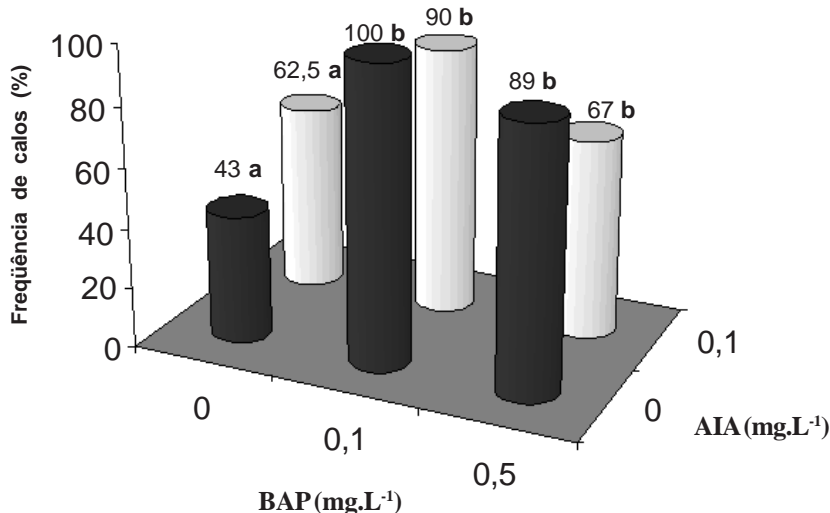


Figura 11: Influência da Benzilaminopurina (BAP) e do Ácido Indolacético (AIA) sobre a formação de calos basais em explantes (nodais cotiledonares e apicais) de *Copaifera langsdorffii* aos 60 dias de cultura. Médias com letras iguais não diferem entre si significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

removendo os resíduos de meio de cultura através da lavagem com água destilada, e o posterior plantio em copos plásticos de 200 mL contendo vermiculita esterilizada umedecida com água autoclavada. Os copos foram cobertos com sacos plásticos. Atualmente essas plântulas encontram-se em sala de crescimento, porém os sacos plásticos foram retirados no 7º dia.

7 - Análise estatística

Os dados observados foram submetidos à análise de variância simples associada ao teste F utilizando o programa Statistix 7.0. Quando o valor de F foi significativo, utilizou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) e LSD ($p < 0,05$). Também se utilizou o teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$) para a comparação de frequências. As diferenças significativas foram representadas com letras diferentes seguidas das médias.

Resultados

1 - Germinação *in vitro*

1.1 - Experimento 1

A germinação *in vitro* (Figuras 1a e 1b), em ponte de papel filtro sobre água destilada e autoclavada, apresentou 75% o valor máximo aos 22 dias. As outras condições de cul-

tivo: ponte-MS, ágar-água e ágar-MS apresentaram 54%, 38% e 17%, respectivamente. No entanto, somente a porcentagem de germinação do meio ágar-MS foi significativamente menor que a do meio ponte-água.

No 33º dia de cultivo a porcentagem máxima de plântulas normais foi atingida. Essa porcentagem foi numericamente inferior ao número de sementes germinadas em todos os tratamentos (Figura 2). Os meios que apresentaram as mais altas porcentagens de plântulas normais foi o meio ponte-água (47%), seguido por ponte-MS (45,8%), que não diferiram significativamente entre si. O meio ágar-MS apresentou a menor por-

centagem (16,6%) que diferiu significativamente dos meios ponte-ágar e ponte-MS.

A relação porcentual entre matéria seca e fresca foi menor (18,9%) no meio ponte-água (Figura 2). Entretanto, somente o meio ágar-MS apresentou valor significativamente superior (24,7 %).

Em todos os tratamentos o grau de infestação foi baixo, variando de 0 a 1 (Figura 3). O porcentual máximo de 30% (Figura 4). A imersão prévia em Benomyl não reduziu a infestação. Não há diferenças significativas nos diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio nos tratamentos testados (Figura 4 e 5).

1.2 - Experimento 2

No 15º dia da inoculação, as sementes não escarificadas e submetidas durante 15 minutos em hipoclorito de sódio apresentaram um grau de infestação significativamente superior aos demais tratamentos testados (Figura 6 e 7). Sementes escarificadas tratadas durante 15 minutos em hipoclorito, bem como nos outros tratamentos cujos tempos de imersão foram acima de 15 minutos, apresentando baixo grau de infestação.

Aos 53 dias da inoculação, a porcentagem de sementes não escarificadas germinadas não diferiu significativamente entre si nos diferentes tempos de imersão testados (Figura 8). Em 60 minutos de imersão, o número de sementes

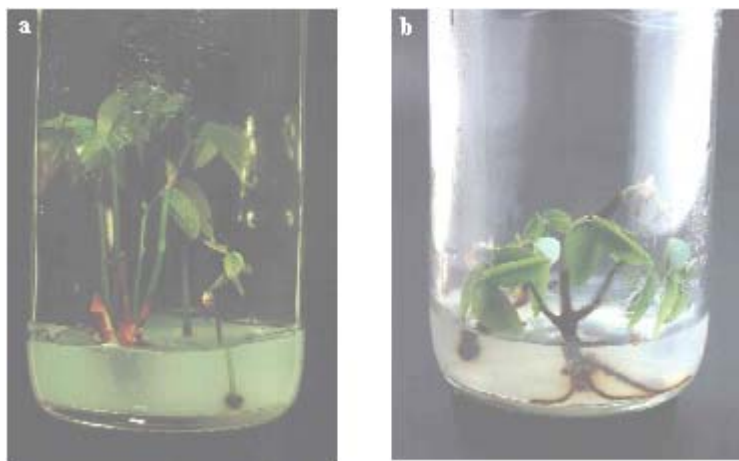


Figura 12: Etapa de multiplicação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* Desf. a) Brotos formados em ½ MS acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP aos 60 dias de cultura; b) Enraizamento no meio de multiplicação em ½ MS acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA aos 60 dias de cultura.

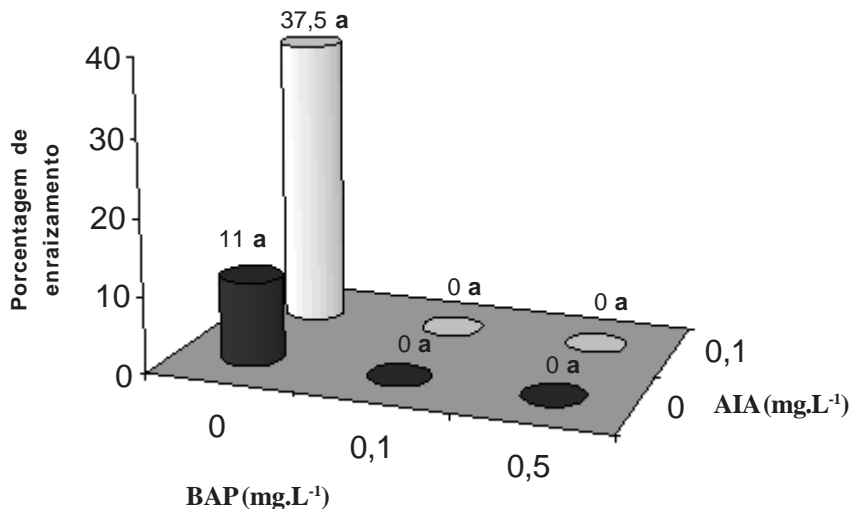


Figura 13: Efeito da Benzilaminopurina (BAP) e do Ácido Indolacético (AIA) sobre a formação de raízes de *Copaifera langsdorffii* no meio de multiplicação aos 60 dias de cultura. Médias com letras iguais não diferem entre si significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

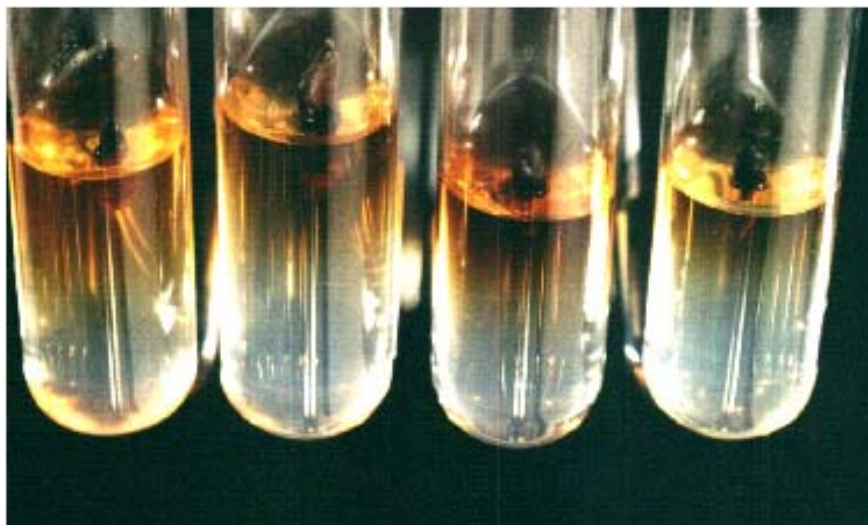


Figura 14: Estabelecimento *in vitro* de explantes de planta adulta de *Copaifera langsdorffii*, aos 6 dias da inoculação.

escarificadas que germinaram foi significativamente inferior às não escarificadas.

3 - Multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais e ápices de plântulas

Os tratamentos que proporcionaram maior número de brotos foram 0,1 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, adicionados de 0,1 mg.L⁻¹ de AIA em explantes nodais cotiledonares (2,28 brotos por explante para ambos), como mostra a Figura 9. No entanto, esses tratamentos não diferiram significativamente (Tukey, $p < 0,05$) dos demais explantes nodais e apicais, exceto os dos tratamentos 0,5 mg.L⁻¹ de BAP; e 0,1 mg.L⁻¹ de

BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA para ápices (1,0 broto por explantes para ambos). Os tratamentos que proporcionaram maior comprimento dos brotos foram os tratamentos 0,1 mg.L⁻¹ de AIA (3,35 cm/broto) e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (3,30 cm por broto), formados a partir de explantes nodais cotiledonares (Figura 10). Esses tratamentos não diferiram significativamente entre si (Tukey, $p < 0,05$) e dos demais tratamentos do mesmo explante, exceto do tratamento sem BAP e AIA (1,31 cm por broto). Também diferiram significativamente dos tratamentos 0,1 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA, aplicados em ápices (0,7 cm por broto para ambos). Os explantes nodais cotiledonares apresentaram

maior número de brotos por explante e brotos de maior comprimento em relação aos apicais.

Os tratamentos que apresentaram maior ocorrência significativa de explantes com calos na região proximal foram os que continham BAP no meio de cultura (Figura 11). A presença de AIA não influenciou significativamente no aumento da frequência de calos basais nos explantes.

O enraizamento durante a fase de multiplicação (Figura 12b) ocorreu no meio sem BAP e AIA (11%) e no meio com 0,1 mg.L⁻¹ (37,5%). Contudo, não foram significativamente diferentes dos demais tratamentos onde a porcentagem de enraizamento apresentou o valor de 0% (Figura 13).

4 - Estabelecimento de culturas a partir de segmentos nodais de plantas adultas

A porcentagem de desinfestação foi 92% e 60% (χ^2 , $p < 0,05$) para o procedimento com e sem banho de imersão de Benomyl, respectivamente. Entretanto, nenhum dos explantes de plantas adultas inoculados *in vitro* sobreviveu aos tratamentos desinfestação, apresentando necrose dos tecidos e liberação de substâncias que escureceram o meio de cultura (Figura 14).

5 - Enraizamento

5.1 - Experimento 1

Aos 30 e 60 dias de cultura não ocorreu o enraizamento de brotos em nenhum dos tratamentos realizados. Entretanto, aos 75 dias de cultura (Tabela 1), 16% das plântulas do tratamento sem carvão haviam enraizado, apesar desse resultado não ser significativo.

5.2 - Experimento 2

Como no experimento 1, aos 30 e 60 dias nenhum dos brotos enraizaram nos diferentes tratamentos testados (Tabela 2). Porém, aos 75 dias de cultura, 16% dos brotos enraizaram em 0,5 mg.L⁻¹ de AIA e em 0,1 mg.L⁻¹ de AIB acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de AIA (Tabela 2). No entanto não

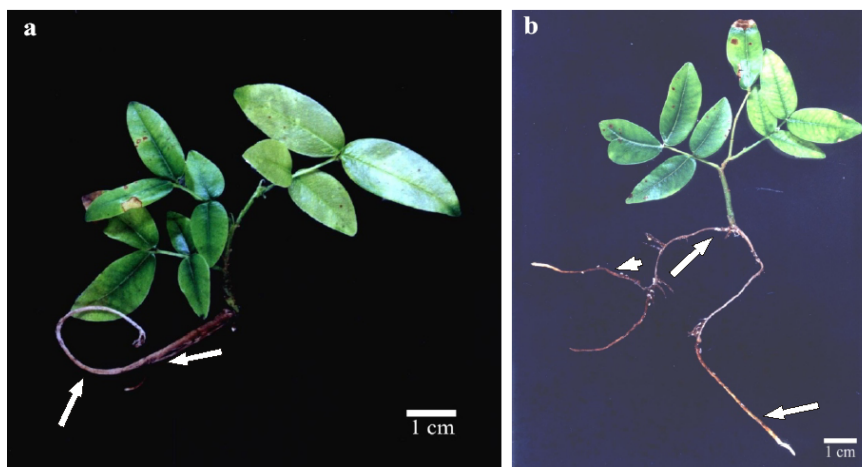


Figura 15: Vitroplântula de *Copaifera langsdorffii* Desf.

a) Enraizada no meio $\frac{1}{4}$ MS acrescido de 0,1 mg.L de AIA e 0,1 mg.L de AIB aos 75 dias de inoculação, setas indicam as raízes adventícias;
b) Aclimatação aos 45 dias. Setas indicam raízes adventícias e ponta de seta indica raiz secundária.

Tabela 1: Efeito do carvão ativo sobre o enraizamento *in vitro* de *C. langsdorffii* aos 75 dias de cultura.

Tratamento (mg.L ⁻¹)	Porcentagem de enraizamento χ^2 (p < 0,05)
Sem carvão	16 % ^{ns}
Com carvão	0

n = 6

Tabela 2: Efeito do Ácido Indolacético (AIA) e do Ácido Indolbutírico (AIB) sobre o enraizamento *in vitro* de *C. langsdorffii* aos 75 dias de cultura.

Tratamento (mg.L ⁻¹)	Porcentagem de enraizamento χ^2 (p < 0,05)
0	0
0,1 AIA	0
0,5 AIA	16% ^{ns}
0,1 AIB	0
0,1 AIB + 0,1 AIA	16% ^{ns}
0,1 AIB + 0,5 AIA	0

n = 6

houve diferenças significativas entre esses tratamentos e os demais. foi observada.

6 - Aclimatação

Morfologicamente, as vitroplântulas (Figura 15a) apresentaram sistema radicular formado por duas raízes adventícias. A formação de calos entre as raízes e a base do broto não

Observações no 45º dia após o início desta fase mostraram todas as vitroplântulas enraizadas se aclimataram. O sistema radicular se

desenvolveu através do alongamento das raízes adventícias e da formação de raízes secundárias, contudo não houve crescimento da parte aérea (Figura 15b).

Discussão e conclusões

Os resultados alcançados nos experimentos de desinfestação de sementes foram satisfatórios. Tempos de imersão em hipoclorito de sódio acima de 15 minutos foram, em geral, mais eficientes e não diferiram significativamente entre si. O tempo de imersão em hipoclorito de sódio não alterou de forma significativa a germinabilidade das sementes, exceto quando estas foram escarificadas e submetidas a 60 minutos de imersão.

Apesar de indicado para diminuir a incidência de contaminação por microrganismos (Melo *et al.*, 1998), o fungicida Benomyl, cuja ação é sistêmica, não atuou significativamente sobre o grau de infestação de sementes de *Copaifera langsdorffii*.

Entre as condições de cultivo utilizadas para a germinação *in vitro*, a que proporcionou melhor resultado foi aquela na qual as sementes germinaram em ponte de papel filtro sobre água destilada e deionizada. A presença de ágar, sais minerais e sacarose, provavelmente, interferiu no potencial osmótico do meio, de modo a torná-lo menor em relação à água pura e, desta forma, influenciando na germinabilidade das sementes (Bewley & Black, 1994). Essa hipótese é sustentada pela menor matéria seca relativa das plântulas em ponte-água, o que indica maior hidratação das plântulas desse tratamento em relação aos demais.

Portanto, em *Copaifera langsdorffii*, a germinação em ponte de papel de filtro sobre água destilada proporciona maior número de plântulas para a reprodução sexuada, como também maior número de explantes para a micropropagação. Além disso, quando o objetivo é a produção de plântulas *in vitro*, esse método permite a transferência mais fácil e menos traumática do sistema radicular. Assim, a germinação em

ponte de papel filtro é mais prática e ainda apresenta a vantagem de ter custo mais reduzido, quando comparada com em meio gelificado com ágar, podendo ser indicada para fins científicos e comerciais.

Apesar do exposto anteriormente, em inúmeros trabalhos a germinação *in vitro* é realizada em ágar, e muitas vezes contendo sacarose, que também reduz o potencial osmótico (Bewley & Black, 1994) do meio de cultura. Constatou-se em *Copaifera langsdorffii* que o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura MS reduziu a germinabilidade das sementes; e a maior porcentagem de germinação ocorreu na ausência de sacarose (Azevedo, 2003).

Outra técnica de germinação *in vitro* que poderia ser testada para esta espécie é o isolamento e cultivo de eixos embrionários. O cultivo de embriões zigóticos *in vitro* é uma técnica que tem sido utilizada para superar a dormência fisiológica de sementes, estudar aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião e principalmente como fonte de explantes, pois os embriões são constituídos de tecidos de elevada totipotência (Hu & Ferreira, 1998).

Na multiplicação a partir de explantes de plântulas, constatou-se que a melhor resposta foi observada nos explantes nodais cotiledonares. Em *Dalbergia sissoo*, a proliferação a partir de nós cotiledonares também apresentou melhores resultados em relação aos demais explantes testados (Pradhan *et al.*, 1998).

Nas concentrações testadas, a BAP não aumentou o número de brotos por explantes. Da mesma forma, a associação BAP de AIA não ocasionou maior comprimento dos brotos em relação ao BAP aplicado isoladamente. No entanto, a adição de BAP ao meio de cultivo inibiu o enraizamento dos explantes, embora tenha propiciado maior frequência de formação de calos basais.

Cultivos com elevadas concentrações de BAP durante um período prolongado, na fase de multiplicação podem ocasionar inibição da formação de raízes na etapa de enraizamento como observado em

diferentes espécies de eucalipto (Grattapaglia *et al.*, 1987). Deste modo, sucessivos subcultivos na ausência de BAP podem ser necessários para a eliminação do efeito residual do BAP (Grattapaglia *et al.*, 1987; Assis & Teixeira, 1998). A formação de calos basais também é relatada em *Leucaena leucocephala*, onde o grau de calosidade é diretamente proporcional ao número de brotos formados, nas diferentes concentrações de BAP testadas (Dhawan & Bhojwani, 1985). Contudo esse comportamento não foi constatado nos ensaios de multiplicação de *C. langsdorffii*.

Em muitas espécies, a combinação de auxinas e citocininas parece ser favorável ao desenvolvimento dos brotos na multiplicação, no entanto, em outros casos essa combinação parece não ser favorável. Em *Stryphnodendron polyphytum* (Barbatimão), a adição de 8,88 μM de BA acrescido de 0,006 μM de AIA, em meio MS, proporcionou o maior número de brotos por explantes. No entanto, a presença de calo basal reduziu o vigor dos brotos em relação ao tratamento com 13,3 μM de BA nas mesmas condições (França *et al.*, 1995). Em *C. langsdorffii*, o acréscimo de AIA não exerceu influência nos parâmetros analisados, nas condições testadas.

O aumento da concentração de BAP não influenciou significativamente o número de brotos por explante como esperado. Provavelmente devido ao fato de as concentrações utilizadas terem sido muito baixas e estarem abaixo do ótimo determinado para esta espécie. Em experimentos utilizando indivíduos jovens de *C. langsdorffii*, estimou-se que a concentração ótima seria, para o maior número de brotos por explantes e maior comprimento maior das brotações, respectivamente, cerca de 0,83 mg.L^{-1} e 0,86 mg.L^{-1} (Azevedo, 2003).

No experimento de estabelecimento a partir de segmentos nodais de indivíduos adultos, coletados em agosto, durante a época seca, não foram observados resultados favoráveis. O uso do fungicida Benomyl controlou a contaminação fúngica,

embora em ambos os procedimentos de desinfestação tenham sido observados o escurecimento e a posterior morte dos explantes. A desinfestação drástica parece ter sido a responsável por esses resultados, apesar de que outros fatores também possam ser atribuídos como causa.

Em algumas espécies arbóreas de maneira geral, existe uma época do ano em que os explantes coletados apresentam melhores resultados quando estabelecidos *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998). Em *Albizia lebeck*, *Cassia fistula* e *Cassia siamea*, as melhores respostas às condições *in vitro* foram observadas a partir de explantes coletados durante a época do ano em que as condições ambientais eram favoráveis ao crescimento (Gharyal & Maheshwari, 1990). Já em *Fraxinus excelsior* L. (Silveira & Cottignies, 1994), apenas os explantes coletados durante a dormência foram capazes de brotar. Desta forma, para o estabelecimento *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* devem ser testados explantes coletados em diferentes épocas do ano.

Muitas das dificuldades encontradas para micropropagar de leguminosas arbóreas são atribuídas às condições fisiológicas existente nos explantes oriundos de plantas adultas. Essas dificuldades estão associadas à recalcitrância desse material às condições *in vitro*, como por exemplo a oxidação dos compostos fenólicos, que ocasionam a morte dos explantes após seu escurecimento (Trigiano *et al.*, 1992). Para contornar esse problema, o uso de substâncias antioxidantes, como o PVP e o Ácido Ascórbico, e técnicas como a microenxertia, que também é utilizada no melhoramento de plantas, podem ser testados (Grattapaglia & Machado, 1998; Pio *et al.*, 2001).

Uma outra hipótese para justificar a ausência de respostas significativas nos tratamentos testados, é a utilização de diferentes genótipos nos ensaios de multiplicação. Em *Glicine max*, a resposta à aplicação de BAP sobre a proliferação de brotos em nós cotiledonares e o desenvolvimento de embriões somáticos

variou nos diferentes cultivares testados (Kerns *et al.*, 1986).

Uma das limitações da cultura de tecidos, como uma alternativa viável de clonagem de espécies leguminosas lenhosas, é o enraizamento de partes aéreas regeneradas *in vitro* (Trigiano *et al.*, 1992). O desconhecimento dos diversos fatores que determinam os fenômenos envolvidos no processo de formação de raízes adventícias residem na dificuldade de isolar e caracterizar os fatores envolvidos nesses processos, bem como a relação entre eles (Assis & Teixeira, 1998). Entre esses fatores, relacionam-se: genótipo, idade fisiológica, balanço hormonal, condições nutricionais, meio de cultura, entre outros (Trigiano *et al.*, 1992).

Na espécie em estudo, o enraizamento obtido foi baixo e não foi significativo nos tratamentos testados, apesar da bem sucedida aclimação das vitroplântulas. Embora a literatura existente relate sobre o uso do carvão ativo para o estímulo de processos morfogênicos, entre eles o enraizamento (Pan & Staden, 1998), o tratamento com carvão ativo na ausência de AIA e AIB não aumentou número de brotos enraizados em relação ao mesmo tratamento sem carvão. Nas concentrações testadas de AIA e AIB, o enraizamento alcançado também não foi significativo.

Apesar dos resultados alcançados não serem significativos, o enraizamento *in vitro* é uma alternativa, uma vez que em casa de vegetação, o enraizamento de estacas de copaíba apresentou valores baixos ou nulos, independente da concentração de AIB e da técnica utilizada (Silva, 1998; Silva & Martins, 1999; Rios, 2001). Portanto, novos ensaios são necessários para aumentar a eficiência do enraizamento *in vitro* da espécie.

Referências bibliográficas

- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M. & RIBEIRO, J. F. 1998. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 464p.
- ANDRADE, A.C.S.; CUNHA, R.; SOUZA, A.F.; REIS, R.B. & ALMEIDA, K.J. 2003. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. **Seed Sci. & Technol.**, v. 31, p. 125-137.
- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. & MELO, P.R.A. 2000. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuwa* Fr. All). **Ciênc. Agrotec.** v. 24, n. 1, p.174-180.
- ASSIS, T.F. & TEIXEIRA, S.L. 1998. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. eds., **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol 1. EMBRAPA Produção de Informação/Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, Brasília, p. 261-296.
- AZEVEDO, K. S. 2003. **Indução e Análises bioquímicas de calos e Aspectos da anatomia foliar de copaíba (Copaifera langsdorffii Desf.)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras. 86p.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1994. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum Press. 445p.
- BEZERRA, A.M.E.; FILHO, S.M.; MOREIRA, M.G.; MOREIRA, F.J.C. & ALVES, T.T.L. 2002. Germinação e desenvolvimento de plântulas de copaíba em função do tamanho e da imersão da semente em ácido sulfúrico. **Revista Ciência Agromômica**, v. 33, n.2, p. 79-84.
- BHOJWANI, S. S. & RAZDAN, M. K. 1983. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier. 512p.
- BONGA, J. M. 1982. Tissue culture techniques In: BONGA, J. M. & DUZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. The Hague: Nijhoff, p. 4-35.
- DHAWAN, V. & BHOJWANI, S.S. 1985. *In vitro* vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Plant Cell Reports** v.4, p.315-318.
- EIRA, T.S.; SALOMÃO, A.N.; CUNHA, R.; MELLO, C.M.C. & TANAKA, D.M. 1992. In: **2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas**. São Paulo, Instituto Florestal, Secretaria do Meio Ambiente. p. 523-526.
- FRANÇA, S.C.; DUARTE, I.B.; MORAES, R. M.; PEREIRA, A.M.S. 1995. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (Barbatimão). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 42 p. 291-293.
- FREITAS, C.V. & OLIVEIRA, P.E. 2002. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae) **Revista Brasil. Bot.**, v.25, n.3, p. 311-321, Setembro.
- GHARYAL, P.K. & MAHESHWARI, S.C. Differentiation in explants from mature leguminous trees. **Plant Cell Reports** v.8 p. 550-553.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. eds., **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol 1. EMBRAPA Produção de Informação/Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, Brasília, p. 183-260.
- GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T.F.; CALDAS, L.S. 1987. Efeito residual de BAP e NAA na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**, 2., 1987, Brasília, DF Resumos... Brasília: ABCPT / EMBRAPA-CNPq, p.10.
- HUANG, L.; CHIU, D.; MURASHIGE, T.; VAN GUNDY, R.; MAHDI, E.F.M.; NAGAI, K. & PLIEGO-ALFARRO, F. Rejuvenation of Trees

- and Other Perennials for Restoration of Plant Regeneration Competence. *In*: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. 1990. Eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPq. 433p.
- KERNS, H.R.; BARWALE, U.B.; MEYER Jr., M.M. & WIDHOLM, J.M. 1986. Correlation of cotyledonary node shoot proliferation and somatic embryoid development in suspension cultures of soybean (*Glycine max* L. Merr.) **Plant Cell Reports** v.5 p.140-143.
- LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- LORENZI, H. 1992. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 352p.
- MELO, J.T.; SILVA, J.A.; TORRES, R.A.A.; SILVEIRA, C.E. & CALDAS, L.S. 1998. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Espécies do Cerrado. p.195-243 *In*: SANO, S.M. & ALMEIDA, S.P., Eds. **Cerrado: ambiente e flora**, EMBRAPA, CPAC. Planaltina, DF, 556 p.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497.
- OLIVEIRA, A.F.; CARVALHO, D. & ROSADO, S.C.S. 2002. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasil. Bot.**, v.25, n.3, p.331-338, Setembro.
- PAN, M.J. & VAN STADEN, J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation** v. 26, p. 155-163.
- PAULA, E.P.; ALVES, J.L.H. 1997. **Madeiras nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso**. Brasília: Fundação Mokiti Okada, 541p.
- PAZ, O.P. & PASQUAL, M. Microenxertia. 1998. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. eds., **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol 1. EMBRAPA Produção de Informação/Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, Brasília, p. 147-159.
- PIO, R.; CASTRO, E.M.; RAMOS, J.D.; GAVILANES, M.L. & RIBEIRO, W.G. 2001. Características anatômicas de porta-enxertos de citros para microenxertia em diferentes alturas. **Ciênc. Agrotec.** v.25, n.4, p.848-852.
- PRADHAN, C.; KAR, S.; PATTNAIK, S. & CHAND, P.K. 1998. Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. Through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes. **Plant Cell Reports**, n.18, p.122-126.
- PRAKASH, O.; SOOD, A.; SHARMA, M. & AHUJA, P.S. Grafting micropropagated tea [*Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze] shoots on tea seedlings - a new approach to tea propagation. 1999. **Plant Cell Reports** v.18, n.10, p.883-888.
- RIOS, M.N.S.; RIBEIRO, J.F. & REZENDE, M.E. 2001. Propagação vegetativa: enraizamento em estacas de espécies nativas de Mata de Galeria. *In*: RIBEIRO, J.F.; FONSECA, C.E.L.; SOUSA-SILVA, J.C. eds. **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria**. EMBRAPA CERRADOS, Planaltina, p. 455-491.
- SANTOS JR, D. & FELIPPE, G. M. 1996. Efeito do tipo e tempo de armazenamento na germinação de sementes de *Copaifera langsdorffii*, *Dimorphandra mollis* e *Schizolobium parahyba*. *In*: **XI Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo**, São Carlos. p. 34.
- SILVA, M.N. 1998. **Enraizamento de estacas de seis espécies nativas de mata de galeria: *Baubinia rufa* (Bong.) Steud., *Calophyllum brasiliense* Camb., *Copaifera langsdorffii* Desf., *Ingalaurina* (Sw.) Willd., *Piper arboreum* Aubl. e *Tibouchina stenocarpa* (DC.) Cogn.** **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, 106p.
- SILVA, L.F. & MARTINS, R.C.C. 1999. Avaliação do enraizamento de estacas de *Copaifera langsdorffii* Desf. *In*: **Quinto Congresso e Exposição sobre Florestas**. Curitiba, Paraná.
- SIQUEIRA, A.C.M.F. & NOGUEIRA, J.C.B. 1992. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. *In*: **Anais do II Congresso Nacional sobre Essências Nativas** (A.C.Covalli, coord.) **Revista do Instituto Florestal** v.4, p.1187.
- SKIRVIN, R.M. 1981. Fruits crops *In*: CONGER, B.V. **Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques**. Boca Raton: CRC Press, p. 55-139.
- TRIGIANO, R.N.; GENEVE, R.L.; MERKLE, S.A.; PREECE, J.E. 1992. Tissue and Cell Cultures of Woody Legumes. **Horticultural Reviews**, v.14, p. 265-331, September.
- VEIGA JR. & PINTO, A.C. 2002. Gênero *Copaifera* L. **Quim. Nova**, v. 25 n. 2 p. 273-286.
- VIEIRA, R.F. & SILVA, S.R. **Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas (Resultados da 1ª Reunião Técnica)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama)/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 184p.