

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E
SUSTENTABILIDADE NA AMAZÔNIA

MICROPROPAGAÇÃO DO CUBIU
(*Solanum sessiliflorum* Dunal)

ROSINEIDE DA PAZ MACHADO

MANAUS – AM
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E
SUSTENTABILIDADE NA AMAZÔNIA

ROSINEIDE DA PAZ MACHADO

MICROPROPAGAÇÃO DO CUBIU
(*Solanum sessiliflorum* Dunal)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia, área de concentração Plantas Nativas e Potenciais Usos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao

MANAUS – AM
2005

Machado, Rosineide da Paz
Micropropagação do cubiu (*Solanum sessiliflorum*
Dunal)/Rosineide da Paz machado. – Manaus: UFAM, 2005.

76 f.; il. Color.

Dissertação (Mestrado) – Manaus, Universidade Federal do
Amazonas, 2005.

1. Cubiu - Reprodução

CDU 635.6(043.3)

ROSINEIDE DA PAZ MACHADO

MICROPROPAGAÇÃO DO CUBIU
(*Solanum sessiliflorum* Dunal)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia, área de concentração Plantas Nativas e Potenciais Usos.

Aprovado em 11 de agosto de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Luis Antônio Serrão Contim
Universidade Nilton Lins

Dra. Paula Cristina da Silva Ângelo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

À memória de meus pais
Expedito Machado e Rosineide
Moreira da Paz que enquanto
presentes sempre me
incentivaram e apoiaram em todos
os passos importantes de minha
vida inclusive para realização
deste trabalho.

Dedico,

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas pela concessão de bolsa de estudos;

Aos meus orientadores Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao e Prof. Dr. José Ferreira da Silva pelo acompanhamento constante;

Ao Prof. Dr. Danilo Fernandes da Silva Filho e Profa. Dra. Rosana Cristina Pereira Parente pelas sugestões e colaboração científica para realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Maria Silvia de Mendonça Queiroz pelo apoio e orientações dadas durante o percurso desse mestrado;

Aos meus familiares pelo apoio principalmente às minhas tias Zenita Gomes Batista, Joana Alves Moreira e irmãs Rosimeire Paz da Silva e Iranilde Silva Burgue;

Aos amigos que de maneira direta ou indireta colaboraram para a produção deste trabalho em especial Adjane Marinho, Albeijamere Castro, Andrezza Vieira, Andréia Vieira, Antônio Balieiro, Bianca Galúcio, Cristiane Silva, Eisner Cunha, Eliselda Correa, Eva Atroch, Hélio Zampieri, Jainy Magalhães, Dr. José Francisco de Oliveira Trigueiro, Juliana Gomes Tuma, Kildere Serrão, Líbia Miléo, Marco Antônio Mendonça, Mirilete Santos, Pedro Queiroz, Rosemary Soares, Sônia Araújo, Simpy, Valdemir Melo e Vitor Repolho.

A todos aqueles que mesmo não tendo sido citados seus nomes ajudaram para realização deste trabalho.

RESUMO

O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), recurso genético originário da Amazônia Ocidental, apresenta potencialidades para a agricultura moderna, dada a sua rusticidade, boa capacidade de produção e ao aproveitamento dos seus frutos de forma diversificada. Por ser uma planta de reprodução sexuada, mantém alta variabilidade genética quanto às características de importância agrônômica, o que não é interessante do ponto de vista comercial, quando se objetiva a uniformização do crescimento e frutificação das plantas. Através da micropropagação é possível a obtenção de clones com características desejáveis como a alta produtividade, qualidade superior ou tolerância ao estresse biótico e abiótico, propiciando a multiplicação rápida e em pequeno espaço físico. Este trabalho teve como objetivo estabelecer protocolos para o cultivo *in vitro* do cubiu. Foram estudadas diferentes concentrações em mg/L dos reguladores de crescimento BAP (0,0; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0) e AIA (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0) e 25 combinações entre estes, em meio MS, na indução e regeneração *in vitro* de brotações e enraizamento do cubiu. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições e 25 tratamentos, constituindo um esquema fatorial de 5x5. As combinações em mg/L de BAP e AIA com as melhores respostas foram respectivamente: para folhas 1,0 e 0,5 produzindo um número médio de 8 folhas por explante; para brotações 3,0 e 0,5 produzindo um número médio de 3,10 brotos por explante; para altura das brotações 3,0 e 0,5 produzindo altura média de 4,17 cm; para raiz 1,0 e 0,5 produzindo número médio de 8,45 raízes e para o comprimento da raiz 1,0 e 0,5 produzindo comprimento médio de 6,4 cm. Foi possível micropropagar a espécie *S. sessiliflorum* adicionando-se ao meio MS os reguladores de crescimento BAP e AIA, obtendo-se além de maiores números de brotações, plantas completas com sistema radicular e altura ideal para aclimatização.

PALAVRAS CHAVE:

Solanum sessiliflorum

cultivo *in vitro*

reguladores de crescimento

ABSTRACT

Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), a genetic resource from western Amazon, presents a great potential for the modern agriculture, on account of its rusticity, good yield capacity and usage of its fruits in various diversified ways. On account of it being a sexual reproduction plant, it keeps a high genetic variability as to the agronomic importance characteristics which are not interesting in a commercial viewpoint, where the purpose is the evenness of the growing plants as well as their fructification. Micropropagation is an alternative for obtaining clones with desirable characteristics such as high productivity, superior quality or biotic and abiotic stress tolerance, providing a fast multiplication within a small physical space. The aim of the present study was to establish protocols for the *in vitro* culture of cubiu. Different mg/L concentrations of the BAP (0.0; 0.5; 1.0; 3.0; 5.0) and AIA (0.0; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0) growth regulators and all possible combinations between them in MS medium were assessed in the *in vitro* induction and regeneration of cubiu sproutings and rooting. The experimental design was in random blocks with five replicates and 25 treatments, constituting a 5x5 factorial scheme. The best BAP and AIA mg/L combinations the following respectively: for leaves 1.0 plus 0.5 producing an average number of 8 leaves per explant; for sproutings 3.0 plus 0.5 producing an average number of 3.10 sprouts per explant; for the height of sproutings 3.0 plus 0.5 producing an average height of 4.17 cm; for root 1.0 plus 0.5 producing an average number of 8.45 roots and for the length of root 1.0 and 0.5 producing a 6.4 cm mean length. It was possible to micropropagate the *S. sessiliflorum* species adding BAP and AIA growth regulators to the MS medium, obtaining a larger number of sproutings as well as complete plants with well developed root system and ideal height for acclimatization.

KEYWORDS:

Solanum sessiliflorum *in vitro* culture growth regulators

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Plântulas de cubiu sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 12 (1,0 de BAP + 0,5 de AIA); tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA).....48
- Figura 2 – Plântulas de cubiu sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 17 (3,0 de BAP + 0,5 de AIA); tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA).....52
- Figura 3 – Plântulas de cubiu sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 9 (0,5 de BAP + 2,0 de AIA); tratamento 12 (1,0 de BAP + 0,5 de AIA) e tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA).....57
- Figura 4 – Plântulas de cubiu sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 12 (1,0 de BAP + 0,5 de AIA) e tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA).....61
- Figura 5 – Plântulas de cubiu sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 2 (0,0 de BAP + 0,5 de AIA); tratamento 7 (0,5 de BAP + 0,5 de AIA); tratamento 17 (3,0 de BAP + 0,5 de AIA) e tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA).....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações na indução e regeneração do n ^o médio de folhas. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da contagem do n ^o de folhas.....	46
Tabela 2 – Teste de Tukey do número médio de folhas por explante do cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal.).....	47
Tabela 3 – Análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações na indução e regeneração do número médio de brotos. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da contagem do número de brotos.....	50
Tabela 4 – Teste de Tukey do número médio de brotos por explante do cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal.).....	51
Tabela 5 – Análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações sobre a altura média dos brotos. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da medida em cm dos brotos.....	55
Tabela 6 – Teste de Tukey da altura média de brotos do cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal.).....	56
Tabela 7 – Análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações sobre indução e regeneração do número médio de raiz. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da contagem do número de raiz.....	59
Tabela 8 – Teste de Tukey do número médio de raízes do cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal.).....	60
Tabela 9 – Análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações sobre o comprimento médio das raízes. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da medida em cm das raízes.....	63
Tabela 10 – Teste de Tukey do comprimento médio das raízes do cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal.).....	64

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Frequência de formas dos frutos (classificação de Alcazar, 1981) em 29 progênes de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) da coleção de germoplasma do INPA.....22
- Quadro 2 – Concentração química do meio M.S. (Murashige & Skoog, 1962) e suas respectivas concentrações.....42
- Quadro 3 – Descrição dos 25 tratamentos resultantes da combinação das cinco concentrações de AIA em mg/L com as cinco concentrações de BAP em mg/L.....43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Aspectos gerais da cultura do cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal).....	15
2.1.1 Origem e distribuição.....	15
2.1.2 Botânica.....	16
2.1.2.1 Classificação taxonômica.....	17
2.1.3 Morfologia.....	17
2.1.4 Usos do cubiu.....	19
2.1.5 Composição química dos frutos.....	19
2.1.6 Variabilidade genética.....	20
2.2 Propagação <i>in vitro</i> de plantas.....	22
2.2.1 Vantagens e desvantagens da cultura <i>in vitro</i>	24
2.2.2 Importância e aplicações da cultura de tecidos vegetais.....	25
2.2.3 Micropropagação: formas de condução e estágios.....	28
2.2.4 Denominadores comuns a todas às modalidades da cultura de tecidos.....	30
2.2.4.1 Explante	30
2.2.4.2 Assepsia.....	32
2.2.4.3 Meio de cultura.....	33
2.2.4.3.1 Sais minerais.....	34
2.2.4.3.2 Açúcares.....	34
2.2.4.3.3 Vitaminas e outras substâncias orgânicas.....	35
2.2.4.3.4 Hormônios vegetais e reguladores de crescimento.....	36
3 METODOLOGIA.....	40
3.1 Local de condução do experimento.....	40

3.2 Aquisição e Assepsia do Germoplasma.....	40
3.3 Germinação das sementes.....	41
3.4 Preparação do meio de cultura.....	41
3.5 Inoculação dos explantes no meio de indução.....	43
3.6 Condução do experimento e coleta de dados.....	44
3.7 Delineamento experimental.....	44
3.8 Procedimentos Estatísticos.....	44
3.9 Modelo Estatístico utilizado.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Desinfestação e germinação das sementes.....	46
4.2 Número médio de folhas.....	46
4.3 Número médio de brotações.....	50
4.4 Altura média das brotações.....	55
4.5 Número médio de raízes.....	59
4.6 Comprimento médio das raízes.....	63
5 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

Dentro da biodiversidade encontrada na Região Amazônica estão disponíveis inúmeros recursos biológicos que podem ser utilizados para o desenvolvimento sustentável da agricultura e agroindústria (EMBRAPA, 2002). O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é um recurso genético que teve origem na Amazônia Ocidental e que pode ser utilizado na agricultura moderna, devido a sua rusticidade, boa capacidade de produção e aproveitamento de seus frutos, os quais possuem conteúdo considerado de nutrientes, de formas diversificadas. Silva Filho (2002) ao estudar 28 etnovariedades (ETN) de cubiu, verificou que o menor valor em percentual (2,3%) de proteína analisado na polpa da ETN 13, foi superior aos valores do teor de proteína encontrado na polpa de todas as espécies cultivadas da família solanácea de maior importância comercial, tais como a batata inglesa (1,0%), tomate (1,0%), pimentão (1,3%) e berinjela (1,1%). O maior teor de proteína encontrado foi 9,2% na ETN 11, valor superior aos encontrados em um grande número de hortaliças e frutas mais consumidas no mundo (SILVA FILHO E MACHADO, 1997; TUMA FILHO, 1997).

Na Amazônia peruana o produto industrializado mais exportado para os países europeus tem sido o suco do cubiu. Na Amazônia brasileira este é cultivado em escala doméstica. No entanto, alguns agricultores estão expandindo suas áreas de cultivo e a produção está sendo fornecida a compradores japoneses que estão usando o fruto como matéria prima para extração de pectina na fabricação de medicamentos para controle do colesterol (SILVA FILHO E MACHADO, 1997).

Por ser uma planta de reprodução sexuada, o cubiu mantém alta variabilidade genética quanto as características de importância agrônômica como forma, número, tamanho e peso de frutos, número de lóculos, espessura da polpa, teor de sólidos solúveis totais, e resistência a pragas e doenças que, por um lado, é importantíssima já que esta característica é requisito

fundamental para seleção de genótipos superiores, que asseguram uma base genética ampla para programas de melhoramento genético de plantas (FROTA *et al*, 2004; PAHLEN, 1977; SILVA FILHO E MACHADO, 1997; SILVA FILHO, 2002). Porém, do ponto de vista comercial a alta variabilidade deixa de ser interessante ao se produzir em grande escala, pois o que se almeja é a uniformização das plantas em crescimento e da frutificação. Dentre as alternativas de se obter clones através da propagação vegetativa está a micropropagação, que é uma das técnicas de cultura de tecidos que permite a reprodução de plantas com características desejáveis como a alta produtividade, qualidade superior ou tolerância ao estresse biótico ou abiótico, além de propiciar a multiplicação rápida e em pequeno espaço físico. A variabilidade na resposta morfogenética *in vitro* existente, não apenas entre espécies do mesmo gênero mas também entre genótipos da mesma espécie, leva a necessidade de se definirem protocolos diferenciados (BORGES JÚNIOR *et al*, 2004; GONZALES *et al*, 2004; PASQUAL *et al*, 1997a; PASQUAL *et al*, 1997b; TORRES *et al*, 1998).

O sucesso da micropropagação depende, não só dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), das condições térmicas e luminosas em que a cultura é mantida, mas também de um meio de cultura apropriado que permita a indução, multiplicação e crescimento das brotações. A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem sido necessária para estimular a multiplicação ou alongamento da parte aérea de muitas espécies. Reguladores de crescimento como a citocinina e a auxina, bem como suas respectivas concentrações, são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (TORRES *et al*, 1998). O mais importante para o processo morfogenético do explante está no balanço ou sinergismo entre as diferentes classes de hormônios e não na quantidade por si só de uma delas (CID, 2000; JESUS *et al*, 2002).

Este trabalho teve como objetivo geral estabelecer a micropropagação do cubiu, e como objetivos específicos avaliar as diferentes dosagens dos reguladores de crescimento

ácido indol acético (AIA) e benzilaminopurina (BAP) e suas interações na indução e regeneração *in vitro* de brotações e enraizamento dessa espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cultura do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal)

2.1.1 Origem e distribuição

A espécie *Solanum sessiliflorum* Dunal variedade *georgicum* é apontada pelos autores Schultes e Romero Castanheda (1962) e Whalen *et al* (1981) como provável progenitora dos cultivares de *Solanum sessiliflorum* variedade *sessiliflorum*. Segundo estes autores a variedade *georgicum* possui espinhos no caule e nas folhas e seus frutos apresentam bagas globosas e relativamente pequenas. Estes autores afirmaram que a perda de espinhos e o aumento no tamanho e variabilidade dos frutos poderiam ser resultantes da seleção humana durante o processo de domesticação. Schultes (1984) e Whalen *et al* (1981) sugeriram que o cubiu teve origem na Amazônia Ocidental, e Brücher (1968) sendo mais específico ainda, relatou que o cubiu pode ter originado no alto Rio Orinoco. O cubiu está distribuído atualmente na Amazônia brasileira, peruana, equatoriana, colombiana e venezuelana, e também pode ser encontrado nos Andes de Equador e Colômbia até 1000 m ao nível do mar. No Brasil, nos municípios ocidentais do Estado do Amazonas, principalmente na região do Alto Solimões, o cubiu é encontrado em condições sub-espontâneas, nas roças e sítios dos índios e caboclos (COUTURIER, 1988; PURCELL, 1964).

2.1.2 Botânica

O cubiu pertence a família Solanaceae, gênero *Solanum* e espécie *Solanum sessiliflorum*. A família Solanaceae está amplamente distribuída nas regiões tropicais e temperadas do mundo. Esta abrange mais de 90 gêneros e apresenta cerca de 2000 a 3000 espécies dentre as quais podem ser encontradas formas herbáceas, arbóreas, arbustivas, epífitas e trepadeiras, assim como espécies consideradas invasoras de certas culturas, comestíveis, venenosas, medicinais e ornamentais. De acordo com D'Arcy (1973), o gênero *Solanum* é o que apresenta maior número de espécies (1400). Este autor propôs para os gêneros e subgêneros, uma subdivisão do gênero em 52 seções, onde se encontra a seção *Lasiocarpum* (Dunal) D'Arcy, do subgênero *Leptostemonum* (Dunal) Bitt, o qual é constituído por 13 espécies dentre elas *Solanum sessiliflorum* (CARDOSO, 1997; HEISER JUNIOR, 1972; STORTI, 1988).

Whalen *et al.* (1981) afirmaram que todos os membros da seção *Lasiocarpum* são sexualmente reprodutivos, autocompatíveis e diplóides. Porém existem barreiras internas bem desenvolvidas para hibridização tais como a incompatibilidade estilar, aborto de sementes híbridas e esterilidade parcial do híbrido.

2.1.2.1 Classificação taxonômica de acordo com Cronquist (1981):

Reino:	Metaphyta
Divisão:	Magnoliophyta
Subdivisão:	Magnoliophytina
Classe:	Magnoliopsida
Subclasse:	Asteridae
Ordem:	Solanales
Família:	Solanaceae

Dependendo da localidade, o cubiu recebe diferentes nomes populares. No Peru este é conhecido como topiro, tupiro e *cocana*, na Colômbia e Venezuela também é chamado de *cocana*, no nordeste, tomate-de-índio e *orinoco apple* e *peach tomato* nos países de língua inglesa.

2.1.3 Morfologia

O cubiu é um arbusto de ciclo anual que varia de 1 a 2 m de altura, ereto e ramificado, com raízes laterais estendendo-se até 140 cm da base da planta e as folhas cobrem uma área pouco menor. Toda a parte aérea é coberta por uma pilosidade densa. Possui folhas simples com pecíolos que alcançam até 14 cm e lâmina até 58 cm de comprimento, alternadas, com arranjo em espiral (em grupo de três). A parte adaxial da folha é de cor cinza, e a parte abaxial é coberta por uma substância açucarada que atrai himenópteros (Apidae, Vespidae, Formicidae) e dípteros. Cada planta apresenta em média nove inflorescências, apresentando

de cinco a nove flores ou botões. Cada inflorescência abre uma a duas flores por dia, e nestas podem ser encontradas flores hermafroditas e estaminadas. As flores são completas, medindo entre 4 a 5 centímetros, possuem pétalas verde-claras, sépalas verdes, cálice maior que a corola, anteras amarelas em número de cinco com 3 cm de comprimento e 1 cm de largura (PAIVA, 1999). Estas abrem por volta das 7:00 h e começam a fechar as 16:00 h. Pahlen (1977) considerou o cubiu uma planta que se auto-fecunda pelo fato de as plantas isoladas apresentarem uma boa produção de frutos. No entanto, este mesmo autor considerou que esta planta deve ter certa quantidade de cruzamentos naturais porque sempre foi observada a presença de abelhas sociais e solitárias, visitando flores e carregando o pólen. Vários outros autores também concordam que esta planta seja autógama (CLEMENT, 1989; SILVA FILHO *et al*, 1993). Entretanto Storti (1988) ao estudar a biologia floral do cubiu relata que o sistema de reprodução dessa espécie é alogâmico, e descreve características que promovem a polinização cruzada tais como o fato das anteras serem do tipo porocida e, portanto, do pólen ser liberado com o auxílio de abelhas vibradoras. Outra característica é o padrão de floração assincrônico em plantas individuais, forçando o polinizador a visitar outras inflorescências de uma mesma planta ou em plantas diferentes.

O fruto do cubiu é de forma variada e de acordo com o genótipo este pode ser redondo, achatado, quinado, cordiforme ou cilíndrico, apresentando coloração verde quando imaturo, amarelo quando maduro, tornando-se marrom avermelhado. A espessura da polpa é proporcional ao tamanho do fruto. Este pode variar de 30 a 450 g e contém de 500 a 2000 sementes glabras, ovaladas e achatadas. O cubiu é propagado exclusivamente por semente (SILVA FILHO, 1998, 2002; TUMA FILHO, 1997).

2.1.4 Usos do cubiu

Os frutos do cubiu apresentam-se como uma alternativa na dieta alimentar da população amazônica. Podem ser consumidos tanto *in natura* como nas formas de sucos, doces e geléias, ou ainda acompanhando pratos à base de carne, frango e peixes. Também são utilizados na medicina popular para reduzir os níveis elevados de colesterol, ácido úrico e glicose no sangue, além do tratamento da anemia. Os índios peruanos Waorani utilizam as folhas, galhos, e raízes das plantas jovens, fervidas e maceradas para tratamento de pessoas mordidas por aranhas e como cicatrizantes de ferimentos externos. Segundo Tuma Filho (1997) moradores da comunidade Breves – Anajás no Estado do Pará, além de utilizarem o cubiu na alimentação o usam para asseio corporal e no tratamento de coceiras. Salick (1987) também afirmou que o cubiu é utilizado pelas populações tradicionais da Amazônia Ocidental para cura de doenças da pele. Silva Filho (2002) relatou que as folhas maceradas são utilizadas pelos índios peruanos e brasileiros para evitar a formação de bolhas na pele em caso de queimaduras provocadas por fogo ou água fervente. Segundo este autor, os caboclos e índios peruanos utilizam o suco puro do cubiu para dar brilho aos cabelos (SALICK, 1992; SILVA FILHO *et al*, 1997).

2.1.5 Composição química dos frutos

Os frutos do cubiu são ricos em ferro, niacina (Vitamina B₅), ácido cítrico e pectina, possuem também vitaminas A e C. O cubiu é considerado um fruto suculento e apresenta de 88 a 93 % de umidade. Possui acidez elevada, o que permite a diluição elevada na formulação de sucos. O teor de sólidos solúveis (°Brix) varia de 5 a 8 e é constituído, em sua maioria, por

açúcares redutores. É considerado um fruto altamente dietético pois possui baixo teor calórico e teores significativos de fibra alimentar, sendo indicado por estas características à pacientes hipercolesterolêmicos e hiperglicêmicos de acordo com Yuyama *et al* (1997). Silva Filho (2002) ao analisar macro e micronutrientes contidos nos frutos do cubiu de 28 etnov variedades estudadas, observou que estas apresentaram, de um modo geral, altos teores de K, Zn e Fe. Este também constatou uma ampla variação genética nestas etnov variedades com relação aos teores de cinzas (6,2% a 12%), de proteína bruta (2,3% a 9,2 %), de lipídeos (1,3% a 27,2%) e de carboidratos (58,5% a 87,3%) (SALICK, 1992; SILVA FILHO *et al*, 1997).

2.1.6 Variabilidade genética

Segundo Silva Filho (2002) as populações com frutos de maior tamanho são procedentes da região do Alto Solimões na Amazônia brasileira, peruana e colombiana e são mais avançadas no processo de domesticação. De acordo com Pahlen (1977), o desenvolvimento da planta e o número de frutos do cubiu são reduzidos em condições adversas, no entanto o tamanho das folhas e dos frutos permanece quase invariável. O mesmo não ocorre com outras Solanáceas, como o tomate, pimentão, berinjela e jiló, nos quais o tamanho das folhas e dos frutos varia de acordo com o desenvolvimento das plantas.

De acordo com estes autores, podem-se considerar os caracteres como forma e tamanho altamente herdáveis já que não variam em sucessivas gerações. Silva Filho (1994) ao avaliar a variação fenotípica em frutos de 29 populações de cubiu encontrou oito formas (Quadro 1), sendo mais comum a forma cordiforme (31%) e a forma cilíndrica (21%). Os frutos globosos variam de pequeno (3,2 cm de comprimento por 3,3 cm de largura) a grande (9,3 cm de comprimento por 7,6 cm de largura), e os pesos médios desses frutos variam de 18,5 g e 301 g respectivamente. Diante da alta variação encontrada para o fenótipo dos frutos,

para fins de industrialização, o mesmo autor sugere direcionar a seleção para o formato redondo, devido a maior facilidade de despulpá-lo mecanicamente.

Silva Filho *et al* (1997) observaram que cinco caracteres, considerados de importância agronômica, exerciam efeito direto e positivo sobre a produção do cubiu, dentre estes, a área da folha que possui papel preponderante na taxa fotossintética da planta, a largura do fruto e o número de lóculos, que são caracteres que estabelecem a uniformidade e a firmeza dos frutos, a espessura da polpa que indica o tipo de aproveitamento que o fruto terá na indústria, e o número médio de frutos que expressa o potencial da espécie em se tratando de produtividade, que segundo Pahlen (1977) pode variar de 20 a 250 t/ha. Outra característica importante a se considerar é o °Brix e o teor de ácido cítrico das etnovariedades de cubiu que variam de 5,0 a 8,2 e 1,1 a 2,0 % respectivamente. Estas características possibilitam a busca de combinações de genótipos que permitam melhorar o sabor dos frutos.

Forma	Frequência (%)
Redondo/Globoso	3,5
Redondo Angular	6,9
Levemente Achatado	17,2
Achatado	3,5
Achatado Irregular	13,8
Cordiforme	31,0
Cordiforme Irregular	3,5
Cilíndrico	20,7

Quadro 1 – Frequência de formas dos frutos (classificação de Alcazar, 1981) em 29 progênies de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) da coleção de germoplasma do INPA.

FONTE: SILVA FILHO, 2002.

2.2 Propagação *in vitro* de plantas

Também chamada de micropropagação, a propagação *in vitro* é uma técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou outros recipientes similares de vidro (por isso o termo *in vitro*), sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais, como luz, temperatura, oxigênio e gás carbônico (CID, 2003; LAMEIRA *et al*, 2000). A cultura de tecidos é a área da biotecnologia que tem atualmente a maior aplicação prática na agricultura. A micropropagação, quando empregada a um programa de melhoramento, torna-se uma

técnica auxiliar muito valiosa, para clonagem a curto prazo de genótipos superiores e para acelerar programas de melhoramento genético (LEDO *et al*, 2000; PASQUAL *et al*, 1997a, 1997b).

A propagação convencional de algumas espécies, que é feita através do uso de sementes, além de gerar variações nas plantas produzidas, só permitirá que estas produzam flores, por exemplo, após seis a sete meses, enquanto que pela propagação *in vitro* e utilizando tecidos adultos, como propágulos (qualquer parte vegetativa de uma planta destinada à propagação), este período pode ser reduzido para três a quatro meses (ARAÚJO *et al*, 2004; PASQUAL *et al*, 1997a). A técnica de cultivar tecidos de plantas *in vitro* possibilita a manutenção de identidade genética dos indivíduos e obtenção de grande número plantas sadias e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto tempo, independentemente da época do ano. Por outro lado, o uso comercial da cultura de tecidos é ainda limitado por alguns fatores, dentre eles a baixa eficiência no desenvolvimento e multiplicação que algumas espécies apresentam sob condições *in vitro*. Vários autores afirmam que a regeneração de muitas espécies depende tanto da fonte de explante utilizada quanto do genótipo e, que a cultura de tecidos, como técnica de propagação vegetativa, necessita ser adaptada às necessidades das espécies e cultivares, pois estas diferem geneticamente entre si, podendo apresentar resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo (COSTA *et al*, 2000; KITTO, 1997; PEREIRA e FORTES, 2003;).

Faria e Illg (1993), analisando a capacidade de regeneração de três cultivares de tomates, a Petomech, Santa Rita e VFN-8, observaram um potencial organogênico baixo quando comparado com a espécie selvagem *Lycopersicum pimpinellifolium*. Fari *et al* (1997), também verificaram diferenças na regeneração *in vitro* das cultivares de tomateiro industrial IPA-5 e IPA-6, onde a cultivar IPA-5 apresentou uma capacidade de regeneração superior à cultivar IPA-6.

A cultura de tecidos é fundamentada na teoria da totipotencialidade formulada por Matthias Schleiden & Theodor Schwann, em 1858 *apud* Cid (2003), a qual afirma que a célula é autônoma e, portanto, contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa.

2.2.1 Vantagens e desvantagens da cultura *in vitro*

Dentre as principais vantagens da cultura de tecidos, além da aquisição de clones de qualidade superior, está a multiplicação rápida de uma grande quantidade de plantas sadias e geneticamente uniformes em pequeno espaço e em curto período de tempo (GONZÁLEZ *et al*, 2004; SÁ e BRAGA, 2002; SILVA *et al*, 1991).

O cultivo *in vitro* torna possível também a criação de banco de germoplasma o qual tem como objetivos principais a conservação de fontes genéticas para futuro uso em melhoramento e estudos em genética, manter coleções de diferentes genótipos devidamente caracterizados e avaliados para o uso em programas de melhoramento, além de ser uma forma de conservar os recursos genéticos. O intercâmbio de germoplasma originado da cultura *in vitro* permite que genótipos sejam transportados entre países com a segurança de que não estão sendo introduzidas doenças, e que ainda cheguem a seu destino em condições de ser propagados, o que frequentemente não ocorre com estacas ou outro tipo de propágulo, devido ao longo tempo que o material permanece até a liberação alfandegária. Outras vantagens dessa técnica são a possibilidade do uso de espécies de propagação vegetativa, tais como plantas estéreis ou produtoras de sementes recalcitrantes, assim como a produção permanente de material, ao qual se pode ter acesso em qualquer época do ano, e a facilidade de preservação de explantes (células, tecido ou órgão utilizado para iniciar o cultivo *in vitro*) isentos de viroses e outros patógenos, além de serem geneticamente estáveis. Atualmente, a

maior concentração da atividade de micropropagação reside na limpeza clonal e na produção de mudas de espécies de interesse econômico. Em sistemas onde a certificação de mudas frutíferas é necessária, a limpeza clonal e a micropropagação são indispensáveis (PASQUAL *et al*, 1997a). Para algumas espécies de importância econômica, como a mandioca e a batata, o intercâmbio internacional já está sendo realizado *in vitro*. Assim como em qualquer outra área, o cultivo *in vitro* também apresenta algumas desvantagens, dentre estas estão a necessidade de subcultivos periódicos, o risco de perda por contaminação e os riscos de danos dos equipamentos de controle ambiental (GONZALES *et al*, 2004; MELO-FARIAS *et al*, 1996; PASQUAL *et al*, 1997b; SALGADO *et al*, 2001; SATO *et al*, 2001b).

2.2.2 Importância e aplicações da cultura de tecidos vegetais

A cultura *in vitro* de plantas tem se mostrado importante não apenas na área florestal e agrícola, mas também na área científica. Assim, dependendo dos objetivos de sua aplicação, a cultura *in vitro* apresenta diferentes modalidades, como por exemplo, cultura de células, tecidos, órgãos, protoplastos, anteras, calos, sementes, etc. Através da cultura de protoplastos, podem-se hibridizar variedades diferentes, vencendo barreiras genéticas, como em cruzamentos considerados incompatíveis. Esta técnica permite tanto a hibridação interespecífica (entre espécies) quanto a intergenérica (entre gêneros) como, por exemplo, podem ser citados os híbridos somáticos entre batata e tomate obtidos por Melchers *et al* (1978). Portanto, a cultura de protoplastos além de possibilitar o aumento da variabilidade genética, permite a transferência de genes desejáveis entre espécies, principalmente das selvagens para as cultivadas (PUGA *et al*, 1991). Com uso da cultura de anteras, podem-se obter plantas haplóides, que logo depois podem-se diploidizar, ou seja, o número de seus cromossomos podem ser duplicados, com o uso de colchicina, que permite originar plantas

diplóides as quais apresentam homozigose em 100% dos locos, ou seja, indivíduos que produzem um só tipo de gameta que, no caso do melhoramento genético de plantas, podem ser utilizados tanto para originar uma nova cultivar quanto para futura hibridação com outro indivíduo. Se este mesmo homozigoto fosse obtido por métodos convencionais, seriam necessárias de 6 a 8 gerações de autofecundação e seleção, requerendo um longo tempo de trabalho. No caso de cultura de células, podem-se obter mutantes, ou seja, genótipos que ganharam ou perderam alguma característica específica. Neste caso, a variação somaclonal que nada mais é do que a ocorrência de modificações genéticas nas células e tecidos cultivados *in vitro*, e a indução de mutações podem gerar variabilidade e fornecer genótipos superiores que também podem ser usados no melhoramento. Também através da cultura de células ou mesmo de tecidos, é possível manipular células isoladas das plantas para estudar efeitos bioquímicos e fisiológicos de herbicida a nível celular, onde os efeitos dos herbicidas podem ser acompanhados sob condições controladas, usando um meio de crescimento definido o que seria mais difícil em um estudo ao nível da planta inteira (CID, 2003; PASQUAL *et al*, 1997b).

Através da cultura de embriões e meristemas, pode-se fazer trabalhos de criopreservação para conservar material de grande importância econômica e em espécies de reprodução assexuada como a batata, mandioca, abacaxi entre outros, em bancos de germoplasmas, com economia de espaço e dinheiro. A conversão *in vitro* de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro, isolados de semente em completo estágio de maturação fisiológico, originando plantas completas e normais, foi obtida por Ledo *et al* (2000). Cid (1985) após duas semanas, obteve a germinação de 50% de embriões de dendê (*Elalis guineensis* J) inoculados e atribuiu a baixa viabilidade a fatores não relacionados à cultura *in vitro*, tais como as condições de armazenamento das sementes, e outras causas ligadas a fatores genéticos (CID, 2003; PAIVA *et al*, 2004).

Através da cultura de meristemas apicais, é possível obter plantas livres de vírus, uma vez que esta é a única parte da planta geralmente não infectada, devido à velocidade da multiplicação celular e à distância do sistema vascular por onde os vírus possam se disseminar. Com o uso dessa técnica foi possível a limpeza de viroses do morango resultando no aumento da produtividade média desta espécie de 3 t/ha para até 12 t/ha (PASQUAL *et al*, 1997a).

Com a cultura de gemas axilares é possível propagar milhares de plantas, com genótipos superiores, por exemplo, com resistência a nematóides, fusarium, entre outros. A micropropagação vem sendo utilizada em solanáceas de grande importância econômica como a batata (*Solanum tuberosum* L.), especialmente na produção de material propagativo com elevada qualidade fitossanitária, o que tem proporcionado benefícios diretos aos produtores, pelo consequente aumento nos níveis de produtividade da cultura (BARBOZA *et al*, 2004; PEREIRA e FORTES, 2003). Apesar de Pahlen (1977) em suas duas experiências em solo franco arenoso com um total de 149 plantas de cubiu afirmar que a presença de nematóides não impediu a colheita dos frutos dessa espécie, este mesmo autor cita que Brücher (1973) ao estudar plantas da espécie *Solanum sessiliflorum* coletado no Alto Orinoco e plantado em terras da Universidade Central da Venezuela, revelou que é praticamente impossível cultivar esta solanácea de alto potencial econômico em escala comercial devido a incidência de *Meloidogyne* sp. Pahlen (1977) também constatou além de outras pragas e doenças a presença deste nematóide em plantas dessa espécie. No entanto, o mesmo autor verificou, na mesma área, a presença de plantas de cubiu com e sem sintomas de murchamento e com e sem nematóides, indicando que pode haver variabilidade genética para resistência a esses fatores. Este é um problema que pode vir a ser resolvido via micropropagação dessa espécie. A cultura de tecidos também dá suporte para realização de trabalhos na área da genética como

na obtenção de plantas transgênicas (CID, 2003; NUNES, 2005; PASQUAL *et al*, 1997a, 1997b; SABÁ *et al*, 2001).

2.2.3 Micropropagação: formas de condução e estágios

Murashige (1974) conceituou estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*, onde o esquema padrão para sistemas de micropropagação dividiu se em:

- a) Estágio I – onde ocorre a seleção de explante, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;
- b) Estágio II – onde é feita a multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação;
- c) Estágio III – onde ocorre a transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo.

Este esquema pode ser modificado conforme as peculiaridades de cada espécie. Também pode ser necessária uma fase adicional de alongamento das partes aéreas antes do enraizamento, ou ainda pode-se eliminar a etapa de enraizamento *in vitro*, manipulando as partes aéreas como microestacas e colocando estas diretamente no substrato de transplântio (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998).

Dependendo do explante utilizado, a micropropagação pode ser conduzida de três formas: através da proliferação de gemas axilares; indução de gemas adventícias por organogênese direta e indireta e via embriogênese somática. Na multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares, os órgãos meristemáticos pré-formados são isolados, e estimulados a crescerem através do uso de reguladores de crescimento dando origem a novas partes aéreas, formando tufos de brotos, os quais são subdivididos em conjuntos menores, ou

cada parte aérea é isolada das demais para formação dos novos explantes. Quando a espécie apresenta naturalmente uma grande capacidade de formação de folhas, e um rápido alongamento do caule, não é necessário a quebra da dominância apical, e boas taxas de multiplicação podem ser obtidas pela subdivisão do caule em diversos segmentos nodais, contendo cada um uma gema axilar. O uso de gemas axilares para micropropagação é geralmente preferível devido ao fato de se produzir *in vitro* um fenômeno natural tornando o sistema de fácil controle e também por apresentar uma fidelidade genética alta (PASQUAL *et al*, 1997a; GOULART, 1991; GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998). Segundo Zepeda e Sagawa (1981), a formação de gemas múltiplas a partir de gemas axilares de uma coroa de abacaxizeiro, cultivadas *in vitro*, possibilitou a formação de 5.000 plântulas, num período de 12 meses.

Na indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta, ocorre a formação de gemas em locais não convencionais, tanto diretamente de tecidos com potencial morfogênético, mas que normalmente não se expressa como câmbio vascular, base de pecíolo, bases de folhas, escamas em bulbos e segmentos de raízes, entre outros, quanto indiretamente quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo. Em se tratando da integridade clonal, as gemas adventícias são também desejáveis como sistema de multiplicação, desde que não passe pela fase de calo, que consiste em uma massa de células desorganizadas originadas de tecidos, órgãos ou células previamente cultivadas e que pode gerar mais variação somaclonal e, portanto variabilidade genética em relação ao progenitor. As partes aéreas, obtidas desse sistema, são individualizadas, enraizadas e transplantadas (TORRES *et al*, 1998).

A multiplicação através da embriogênese somática consiste na formação de embrióides (embrião originado de uma célula somática) a partir de tecido somático com constituição idêntica à da planta matriz a não ser nos casos em que ocorre a embriogênese por

via indireta passando pela formação de calo. A maioria dos sistemas via embriogênese somática ocorre de forma indireta onde os calos embriogênicos são induzidos e matidos ao longo da multiplicação. A multiplicação via embriogênese somática apresenta algumas limitações tais como a variabilidade genética indesejável que muitas vezes é obtida por esse processo. Segundo Ammirato (1983) e Krikorian *et al* (1983) nesse sistema de multiplicação, ocorrem anormalidades genéticas em geral como resultado da passagem pela fase de calo, onde as células estão mais sujeitas a sofrerem alterações. Outro problema desse sistema é a perda gradual do potencial de regeneração de plantas após algumas subculturas. Smith e Street (1974) verificaram mudanças na citologia nuclear de células de cenoura, o que levou o surgimento de células com baixo ou nenhuma totipotência (PASQUAL *et al*, 1997a).

2.2.4 Denominadores comuns a todas às modalidades da cultura de tecidos

Apesar de toda a diversidade de técnicas, a cultura de tecidos possui alguns denominadores comuns a todas as suas modalidades, tais como o processo de assepsia, a utilização de explantes e de um meio nutritivo, além de fatores ambientais como luz, temperatura, gás carbônico e oxigênio, que geralmente são controlados (CID, 2003).

2.2.4.1 Explante

O explante é fundamental para iniciar a cultura *in vitro*. Este pode ser desde uma célula, tecido ou até um órgão como uma folha, flor ou fruto, ápice radicular ou caulinar, gema axilar, segmento de folha jovem, antera, ovário, embrião zigótico, etc. É importante que as fontes de explantes estejam saudáveis e livres de contaminações, pois esse fator irá determinar a facilidade em se descontaminar o explante durante seu isolamento. Também

deve-se ter preocupação com organismos de natureza endógena, os quais não são expostos aos agentes desinfestantes e devem ser controlados já na planta matriz, em ambiente mais limpo como casa de vegetação, ou câmara de crescimento, pois no campo a planta fica exposta a todo tipo de intempérie e insetos que provocam ferimentos e permitem a entrada de microrganismos. Em geral os cultivos são melhor estabelecidos a partir de explantes coletados no início ou durante o crescimento ativo da planta mãe. No entanto, a respostas dos explantes depende da cultura e em particular do genótipo e da quantidade relativa de contaminação e oxidação destes. Tecidos jovens de roseira possuem menor tendência ao escurecimento no momento da excisão do que tecidos mais velhos, porém o mesmo não ocorre em explante muito jovem de café, pois estes mostraram maior intensidade de oxidação do que explantes tirados dos tecidos mais velhos. O escurecimento pode ocorrer também em tecidos cultivados após um período de crescimento como ocorreu com o *Sorghum* e *Parthenium hysterophorus* que após produzirem calos, tornam se escuros e em seguida necróticos depois de cultivados por algum tempo. O grau de escurecimento do explante pode ser diminuído reduzindo a extensão de corte do mesmo durante a excisão ou esterilização (CID, 2003; PASQUAL *et al*, 1997 a).

Segundo Pasqual *et al* (1997a) pode haver diferenças na capacidade de explantes crescerem *in vitro* entre plantas da mesma espécie. De acordo com o autor as respostas obtidas dependem do tipo de explante, tamanho, idade e forma de cultivo. Dentre estes, a idade ontogenética e a idade do órgão se mostram como os fatores mais importantes. Com relação à idade ontogenética ou fisiologia, o explante é considerado jovem ou adulto se é derivado de uma parte da planta na fase de crescimento juvenil ou adulta. Quanto ao grau de diferenciação, as partes mais jovens de uma planta são as células meristemáticas, não diferenciadas, enquanto que as células diferenciadas dos órgãos são mais velhas. Portanto,

explantes extraídos de tecidos de uma planta juvenil, especialmente de plântulas, são em geral os que melhor respondem nos cultivos *in vitro*.

Explantes podem derivar plantas diretamente ou passar por uma etapa intermediária de calo, antes de a planta ser obtida. Essa massa de células não diferenciadas a qual se denomina calo, encontra-se em contínua proliferação celular, e pode ser caracterizada quanto à sua consistência compacta ou friável e sua cor esbranquiçada ou amarelada (CID, 2003; PASQUAL *et al*, 1997 a).

2.2.4.2 Assepsia

O cultivo *in vitro* exige rigorosa assepsia, pois o contato de microrganismos com meio de cultura promoverá o desenvolvimento destes e inviabilizará a cultura que se deseja estabelecer. A assepsia consiste no conjunto de medidas a serem tomadas para impedir a entrada e proliferação de microrganismos tais como bactérias, fungos, leveduras, entre outros. Várias podem ser as fontes de contaminação e, portanto, todos os materiais envolvidos no trabalho de cultura de tecidos devem passar por um processo adequado de assepsia e esterilização (CID, 2003; PASQUAL *et al*, 1997 a; PUGA *et al*, 1991).

Segundo Cid (2003) para evitar a contaminação do explante, é inevitável o uso de antissépticos, que podem ser bacteriostáticos ou germicidas. Estes podem ser antibióticos, álcoois (álcool etílico), halogênios (hipoclorito de sódio), sais de metais pesados (bicloreto de mercúrio), fungicidas orgânicos entre outros. Quanto aos materiais como vidraria, pinças, bisturis, e os meios de cultura, estes devem ser esterilizados para que se destruam todos os microrganismos, seja por calor seco (forno, ar quente) ou úmido (autoclave). Cid (2003) afirma ainda que utensílios metálicos que serão utilizados na manipulação do tecido podem ser esterilizados por flambagem direta em lamparina com álcool ou bico de Busen na câmera

de fluxo laminar, que é um ambiente axênico, ou seja, ambiente totalmente livre de germes. Segundo Pasqual *et al* 1997a, as substâncias de ação germicida mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro como o hipoclorito de sódio (0,5 a 2%) e de cálcio. Para melhorar o contato das soluções a base de cloro, com a superfície dos tecidos, geralmente é utilizado um espalhante adesivo, sendo o Tween 20 o mais comum, do qual normalmente adiciona-se de 1 a 2 gotas/100ml para aumentar a penetração da solução no tecido. Segundo este autor, o etanol a 70% e 80% é utilizado por alguns segundos, pois acima desta concentração além de ser menos eficiente, pode desidratar rapidamente os tecidos, e além da ação germicida, este atua como substância surfactante e quando aplicado antes facilita a ação de outros produtos. Após a desinfestação, são feitas lavagens sucessivas com água destilada e autoclavada para só então os explantes serem inoculados no meio de cultura. O álcool a 70% também é utilizado para pulverizar as mãos e mesa da câmara. Ao contrário do exposto por Cid (2003), Pasqual *et al* (1997 a) afirma que a única finalidade da flambagem é de eliminar o álcool, e que a desinfestação dos utensílios utilizados na câmara de fluxo laminar é feita pelo álcool a 95% e a esterilização de instrumentos e vidraria deve ser realizada em autoclave a 120°C por 30 minutos ou em estufa a 140 a 160 °C por 2 a 3 horas.

2.2.4.3 Meio de cultura

Na natureza, as plantas são autotróficas, necessitando para seu crescimento e desenvolvimento *in vivo* de um substrato, sais minerais essenciais, água, gás carbônico e energia (luz). No entanto um explante, o qual é somente uma pequena parte da planta não chega a ser autotrófico e, portanto requer para seu crescimento um meio nutritivo, suplementado com as necessidades básicas da célula. Segundo Pasqual (1997c) o meio de cultura serve para suprir os tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutriente que são

necessários ao crescimento. Este fornece além de macro e micronutrientes, carboidratos para substituir o carbono que a planta na natureza fixa da atmosfera através da fotossíntese. Para um melhor desempenho no crescimento e desenvolvimento das plântulas, normalmente são adicionados alguns componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (TORRES, 1997). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), existem várias formulações de meios, dos quais os mais conhecidos são Murashige e Skoog (MS), White, Nitsch e Nitsch, Gautheret, Gamborg (B5), Erickson (ER), Shenk e Hildebrandt (SH) e Heller (HE) porém, não existe uma formulação padrão de meio pois as exigências nutricionais para o crescimento ótimo de um determinado tecido podem variar em cada espécie e mesmo na própria planta. Segundo Torres (1997), explantes de diferentes partes da planta podem requerer meios específicos para um crescimento satisfatório. No entanto, o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suas modificações e diluições têm apresentado bons resultados para diversas espécies (SATO *et al*, 2001a).

2.2.4.3.1 Sais minerais

De acordo com Cid (2003) os elementos que compoem o meio nutritivo da cultura *in vitro* devem pertencer à categoria dos essenciais, ou seja, elementos sem os quais a planta não se desenvolve. Existem dois grupos destes elementos: os macro e micronutrientes. No grupo dos macronutrientes, encontram-se: nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, enxofre, cálcio, e no grupo dos micronutrientes estão: manganês, zinco, boro, cobre, molibdênio, cobalto, iodo, silício, alumínio, níquel, ferro e quelatos de ferro, cloro e sódio. Os macronutrientes são adicionados em forma de sal e acima de 100 mg por litro, enquanto que os micronutrientes são adicionados na quantidade de fração de miligramas por litro.

2.2.4.3.2 Açúcares

Considerando que todas as células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* são heterotróficos e, portanto, dependem de uma fonte externa de energia, é essencial que se incorpore ao meio uma fonte de carbono. Os carboidratos fornecem energia e esqueletos de carbono, os quais são utilizados para biossíntese de polissacarídeos, aminoácidos, e proteínas. Segundo Pasqual *et al* (199c) existem várias fontes de carboidratos, como por exemplo, a maltose, rafinose, frutose, manose, galactose, e lactose, sendo a sacarose o carboidrato mais comumente utilizado devido certas características tais como: alta solubilidade, rápida metabolização, e por ser o açúcar mais transportado e armazenado pela maioria das células vegetais. De acordo com Couceiro *et al* (2001) a sacarose é o carboidrato mais utilizado em trabalhos de micropropagação de muitas espécies como, por exemplo, a bananeira na qual a concentração normalmente utilizada é de 20 a 30 g. L⁻¹, e sua ausência provoca em pouco tempo a morte do explante. Concentrações muito altas também são prejudiciais, pois a planta não consegue absorver os nutrientes e nem a sacarose por osmose. Pasqual *et al* (2002) também afirma que este açúcar é o carboidrato mais utilizado nos meios de cultivo, e que possui a capacidade de suportar as mais altas taxas de crescimento na maioria das culturas. Em citros concentrações ótimas podem variar de 2 a 7 % de acordo com o tipo de explante (ARAÚJO *et al*, 2004).

2.2.4.3.3 Vitaminas e outras substâncias orgânicas

O uso de pequenas quantidades de alguns nutrientes orgânicos tais como vitaminas, aminoácidos, e outros suplementos indefinidos como leite de coco, extrato de malte, extrato de leveduras entre outros, proporcionam o crescimento e a morfogênese na cultura de tecidos.

As vitaminas são importantes fatores catalíticos de rotas metabólicas nas células (PASQUAL *et al*, 1997c). Segundo Cid (2003) as vitaminas mais específicas tais como B1 (tiamina), B6 (piridoxina), ácido nicotínico, são mais utilizadas nos meios de cultura. O mio-inositol é um composto que possui a capacidade de induzir a formação de pectina e hemicelulose necessária na parede das células das plantas e desempenha um papel importante na absorção e utilização de íons. De acordo com este autor, muitos autores consideram este composto como uma fonte complementar de carboidratos.

Embora a cultura de tecidos possa ser realizada em meios líquidos, quando o explante precisa ser mantido na superfície do meio, geralmente utilizam-se meios sólidos ou semi-sólidos os quais podem ser obtidos através do uso de agentes que proporcionem esta condição física tais como, por exemplo, o Gelrite, o Gel-Gro, agarose, e o ágar que é o mais comumente utilizado. Este consiste de um polissacarídeo extraído de algas marinhas. A vantagem do uso deste agente geleificante é que o mesmo se mantém estável nas temperaturas de cultura e não é digerido por enzimas presentes no explante (PASQUAL *et al*, 1997c).

2.2.4.3.4 Hormônios vegetais e reguladores de crescimento

Segundo Pasqual *et al* (1997c), todas as plantas possuem naturalmente em sua composição algumas substâncias químicas que regulam os processos metabólicos envolvidos no seu crescimento e desenvolvimento. De acordo com Cid (2003), são essas substâncias conhecidas como hormônio que direcionam o processo morfológico da planta. Segundo este autor, substâncias sintéticas denominadas de reguladores de crescimento também podem ser aplicadas a plantas inteiras ou a segmentos de tecidos vegetais para induzir atividades fisiológicas similares a que os hormônios provocam. Cid (2000) refere-se aos hormônios como mensageiros químicos, pois estes possuem a função de transportar informação, ou seja,

sinais internos e exógenos de uma zona a outra, coordenando desta forma o crescimento e desenvolvimento da planta. Os hormônios vegetais são constituídos por moléculas relativamente pequenas as quais são sintetizadas em pequenas quantidades num determinado ponto da planta podendo ser transportado ou não a outro lugar, onde regula processos determinando respostas bioquímicas, fisiológicas e ou morfogênicas. Como exemplo desse transporte podem ser dados a auxina que se produz no ápice e se movimenta pelo caule em direção basípeta e as citocininas que ao contrário das auxinas são transportadas das raízes, local onde são sintetizadas, até às folhas. Segundo Cid (2003) os hormônios vegetais e os reguladores de crescimento estão inseridos em cinco grupos principais: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, e ácido abscísico, sendo os três primeiros os mais usados na micropropagação. De acordo com Pasqual *et al* (1997c) as auxinas e as citocininas são os grupos de hormônios mais importantes para a regulação do crescimento e da morfogênese de tecidos e órgãos, e dentro desses dois grupos também podem ser encontrados reguladores sintéticos com atividade biológica que se iguala ou excede às dos hormônios. Em trabalhos de micropropagação, as concentrações de cada regulador de crescimento podem variar e também podem precisar ser ajustadas de acordo com o genótipo da planta a ser cultivada e o tipo de tecido ou órgão. Outro fator importante exposto por Cid (2000) é o sinergismo entre os hormônios e ou reguladores de crescimento ou mesmos efeitos antagônicos que podem existir entre os mesmos. Por esta razão estas substâncias devem estar na proporção adequada, ou seja, deve haver um balanço ideal para iniciar o crescimento ou diferenciação nas culturas *in vitro*, o qual pode variar de acordo, como já exposto anteriormente, com o tipo de explante o genótipo e as condições culturais. De acordo com Pasqual *et al* (1997c), a formação de brotações axilares em algumas espécies pode ser promovida pela interação entre as concentrações de auxina e citocinina. A utilização desses dois grupos de fitorreguladores em protocolos para micropropagação de abacaxizeiro é citada por vários autores que também

utilizaram o meio MS para o estabelecimento das culturas (ARAÚJO *et al*, 2004; BARBOZA *et al*, 2004; COUCEIRO *et al*, 2001; GONZÁLEZ *et al*, 2004; TORRES, 1997).

São incluídas no grupo das auxinas as substâncias naturais e sintéticas capazes de controlar vários processos distintos tais como o crescimento e alongamento celular. Além de iniciarem a divisão celular, também estão envolvidas na origem de meristemas, promovendo o crescimento tanto de tecidos desorganizado como para órgãos definidos. Dentre as auxinas mais usadas encontram-se o AIA (ácido 3-indol acético), AIB (ácido indol butírico), ANA (ácido naftaleno-acético), 2,4-D (2,4-diclorofenoxi acético), 2,4,5-T (ácido tri-cloroenoxi acético), 4-CPA (ácido 4-clofenoxiacético) e picloram. O AIA foi o primeiro hormônio vegetal identificado em 1928, o restante são auxinas sintéticas. Uma das vantagens de se usar essas auxinas está relacionada ao fato destas substâncias serem termo-estáveis, ou seja, não decompondo quando autoclavadas. Segundo Pasqual *et al* (1997c) as células meristemáticas são locais ativos para a biossíntese e liberação das auxinas naturais e o seu deslocamento ocorre na forma livre, através do floema, câmbio vascular e xilema. Basicamente a promoção do crescimento dos tecidos da planta ocorre de duas maneiras: através da indução da liberação de íons hidrogênio dentro e através da parede da célula, a ação da auxina leva à quebra de lipídeos e à acidificação da parede, facilitando a sua extensão, enquanto isto, íons de potássio são colocados na célula para neutralizar a exportação de H^+ (prótons) tendo como consequência a redução do potencial hídrico de célula de modo que a água entra e a célula se expande; a outra forma se dá através da ativação da expressão gênica e, portanto, da síntese protéica subsequente, as quais são requisitadas para o crescimento. Quanto à sua influência na morfogênese, está relacionada em promover alterações na fisiologia dos tecidos. Segundo Torres (1997) as concentrações de auxina no meio variam de 0,01 a 10 mg/L. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o uso do AIA no início do cultivo é interessante, pois supre as necessidades iniciais dos explantes. Este autor afirma que a presença de AIA foi benéfica

no isolamento de segmentos nodais de *Eucalyptus* e meristemas florais de couve flor, e que as partes aéreas da multiplicação necessitam da auxina exógena para estimular a rizogênese.

Grattapaglia e Machado (1998), relatam que a definição do tipo e da concentração ótima de citocinina constitui um passo importante para o sucesso da multiplicação *in vitro*. Estas substâncias derivadas da adenina são indispensáveis para quebra de dormência e indução de proliferação de gemas axilares. Das citocininas mais utilizadas em cultura de tecidos destacam-se a CIN (cinetina), BAP (6-benzilaminopurina), Zea (zeatina), Zip (isopentenil adenina) e TDZ (thidiazuron). O BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de ser a mais barata de todas. Hu & Wang (1983), estudaram a frequência de utilização de cada citocinina em meios de cultura para cerca de 100 espécies e, verificaram que o BAP é utilizado em 68 % dos meios, e suas concentrações podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante. Geralmente as concentrações de citocininas para multiplicação estão entre 0,1 a 5,0 mg/L. De acordo com Pasqual *et al* (1997c) foi demonstrado que as citocininas são requisitadas para regular a síntese de proteínas envolvidas na formação e funcionamento do fuso mitótico, culturas na ausência de citocinina tornam-se limitadas e a divisão nuclear das células fica interrompida em um estágio do ciclo celular. Segundo este autor, para a obtenção de morfogênese mais eficaz, deve haver um balanço adequado entre auxinas e citocininas. A utilização do BAP foi importante na regeneração de ramos em *Lycopersicon*, sendo a organogênese a principal via para a regeneração de ramos em quase todas as espécies desse gênero (ARAÚJO *et al*, 2004; COSTA *et al*, 2000).

3 METODOLOGIA

3.1 Local de condução do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecido de Plantas da Universidade Federal do Amazonas, localizado no Mini-campos da UFAM, situado a Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, n ° 3000, Campos Universitário , Bairro Coroado I, Manaus - AM.

3.2 Aquisição e Assepsia do Germoplasma

As sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) foram obtidas no Banco de Germoplasma do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas – INPA. Estas são da cultivar Alejo a qual possui características agronômicas importantes tais como: produção média de frutos de 60 t/ha, com peso médio de frutos de 100 g, além de possuir resistência ao patógeno *Sclerotium rolfsii* Sacc. As sementes passaram por um processo de assepsia, no qual foram lavadas com água e detergente, em seguida, em câmara de fluxo laminar foram imersas em álcool a 70% durante 1 minuto sob constante agitação e lavadas com água destilada autoclavada, logo após foi feita a desinfestação superficial com água sanitária a 30% acrescida de duas gotas de Tween 20 por 20 minutos, também sob constante agitação, posteriormente as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada autoclavada e colocadas para secar em placa de Petri contendo papel filtro, para retirar o excesso de água.

3.3 Germinação das sementes

Ainda em câmara de fluxo laminar, foram colocadas 50 sementes em cada uma das 20 placas de petri contendo em seu interior algodão e papel de filtro esterilizados e umedecidos com água destilada autoclavada. Em seguida as placas foram vedadas com parafilme e levadas para a sala de incubação sob condições controladas de cultivo, com fotoperíodo de 16 horas/luz, intensidade luminosa de 1000 lux e temperatura variando de 30° C (dia) a 20° C (noite).

3.4 Preparação do meio de cultura

O meio de cultura utilizado neste experimento foi o meio M.S. descrito por Murashige & Skoog (1962), para o preparo do qual os componentes e suas respectivas concentrações encontram-se descritas no Quadro 2. Para um total de 500 tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura, foram preparados 5 litros do meio M.S., aos quais foram adicionados 150 g de sacarose, o equivalente a 30g /L, mais 100 ml de cada solução estoque nutritiva, equivalente a 20 ml/L. Após agitar a solução, foram colocados 100 ml desta em 25 Erlenmeyers devidamente etiquetados e identificados. Em seguida foram adicionados AIA e BAP em cada um dos 25 Erlenmeyers conforme os tratamentos. Adicionou-se 100 ml de água destilada em uma proveta e, antes de colocar esta medida em cada erlenmeyer (já contendo meio com os reguladores de crescimento), foi retirada desta a quantidade de água equivalente à quantidade das soluções dos reguladores de crescimento, afim de que resultasse num total 200 ml de solução em cada Erlenmeyer. Logo após, foi medido e ajustado o pH das soluções para 5,8 utilizando-se as soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) a 0,5 N. Posteriormente, foi adicionado 1,8 g de ágar em cada uma das soluções (o equivalente a 9g

/L). Com a finalidade de dissolver o ágar, as soluções foram aquecidas no forno microondas por 3 minutos e logo em seguida foram vertidas para os tubos de ensaio os quais foram tampados e colocados para autoclavar durante 20 minutos com temperatura de 120 °C e pressão de 1atm (PASQUAL *et al*, 1997a).

SAIS		SOLUÇÃO FINAL	
MACRONUTRIENTES	P.M	mg/L	mM
Solução I - NH ₄ NO ₃	80,04	1649	20,6
Solução II - .KNO ₃	101,11	1901	18,8
Solução III - CaCl ₂ .2 H ₂ O	147,02	441	3,0
Solução IV - MgSO ₄ .7 H ₂ O	246,50	370	1,5
KH ₂ PO ₄	136,09	170	1,25
Solução V - Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	372,25	37,23	0,1
FeSO ₄ .7 H ₂ O	278,03	27,80	0,1
MICRONUTRIENTES	P.M	mg/L	µM
H ₃ BO ₃	61,83	6,18	100
MnSO ₄ . H ₂ O	169,1	16,90	100
Solução VI- ZnSO ₄ .7 H ₂ O	287,54	8,63	30
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	241,95	0,242	1
CoCl ₂ .6 H ₂ O	237,93	0,0238	0,1
CuSO ₄ .5 H ₂ O	249,68	0,0250	0,1
SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS	P.M	mg/L	µM
Inositol	180,2	99,110	550
Tiamina	337,27	10,118	30
Solução VII- Piridoxina	205,64	2,056	10
Ácido nicotínico	123,11	1,847	15

Quadro 2 – Concentração química do meio M.S. (Murashige & Skoog, 1962) e suas respectivas concentrações.

FONTE: MURASHIGE e SKOOG , 1962.

3.5 Inoculação dos explantes no meio de indução

Em câmara de fluxo laminar, foram excisados pequenos segmentos do caule da plântula medindo aproximadamente de 0,5 a 0,7 cm de comprimento, contendo uma gema lateral. Estes segmentos nodais foram inoculados verticalmente e individualmente em cada tubo de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura com reguladores de crescimento de acordo com as diferentes combinações das concentrações destes em mg/L, conforme os tratamentos descritos no Quadro 3:

mg/L

AIA \ BAP	0,0	0,5	1,0	2,0	3,0
0,0	1	2	3	4	5
0,5	6	7	8	9	10
1,0	11	12	13	14	15
3,0	16	17	18	19	20
5,0	21	22	23	24	25

Quadro 3 – Descrição dos 25 tratamentos resultantes da combinação das cinco concentrações de AIA em mg/L com as cinco concentrações de BAP em mg/L. UFAM – Manaus/AM, 2005.

3.6 Condução do experimento e coleta de dados

Após a inoculação, os explantes foram transferidos para a sala de crescimento por 43 dias sob condições controladas de cultivo, com fotoperíodo de 16 horas/luz, intensidade luminosa de 1000 Lux e temperatura variando de 30° C (dia) a 20° C (noite). Durante esse período, foram observados e anotados número médio de folhas, número médio de brotações, altura média das brotações, número médio de raízes e comprimento médio das raízes. A avaliação final foi feita após os 43 dias.

3.7 Delineamento experimental

Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro blocos e 25 tratamentos (combinações das concentrações dos reguladores de crescimento AIA e BAP), constituindo um esquema fatorial de 5x5.

3.8 Procedimentos Estatísticos

Análise de variância dos fatores estudados para a avaliação do número médio de folhas, número médio de raiz, número médio de brotações, comprimento médio das raízes e altura média das brotações, serviu para determinar as diferenças existentes nas dosagens de hormônio AIA e BAP e nas interações destes nas variáveis analisadas, conforme o modelo matemático, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O software utilizado foi o Statistical Analysis System (S.A.S.), versão 6.2 para microcomputador (MONTGOMERY, 2001).

3.9 Modelo Estadístico utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \tau\beta_{ij} + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desinfestação e germinação das sementes

As concentrações de álcool a 70% durante 1 minuto e água sanitária a 30% durante 20 minutos, foram satisfatórias para a desinfestação das sementes, as quais iniciaram a germinação a partir do quinto dia após a sementeira. As sementes de cubiu tiveram boa porcentagem de germinação, acima de 90%.

4.2 Número médio de folhas

A análise de variância para o número médio de folhas encontra-se na Tabela 1 e verifica-se que houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F, entre as diversas concentrações de AIA e BAP, assim como para a interação entre estes fatores.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio
AIA	4	7,16 *
BAP	4	21,00*
Interação (AIA x BAP)	16	2,92*
Blocos	3	2,62*
Resíduo	72	0,59
CV (%)		14,43

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações na indução e regeneração do n ° médio de folhas. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da contagem do n ° de folhas. UFAM – Manaus/AM, 2005.

* Significativo ao nível de 1 % de probabilidade.

Tratamentos		Folhas
Concentrações de AIA em mg/L	Concentrações de BAP em mg/L	
0,0	0,0	5,25 b
	0,5	4,60 c
	1,0	6,05 a
	3,0	5,85 a
	5,0	4,70 c
0,5	0,0	6,05 b
	0,5	6,30 b
	1,0	8,00 a
	3,0	6,50 b
	5,0	4,85 c
1,0	0,0	5,60 ab
	0,5	5,35 b
	1,0	6,45 a
	3,0	5,55 b
	5,0	3,75 c
2,0	0,0	4,95 b
	0,5	6,15 a
	1,0	5,80 ab
	3,0	5,80 ab
	5,0	2,05 c
3,0	0,0	3,25 b
	0,5	6,75 a
	1,0	6,50 a
	3,0	4,10 b
	5,0	3,75 b

Tabela 2 – Teste de Tukey do número médio de folhas por explante do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de significância de 5%. UFAM – Manaus/AM, 2005.

Os efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP podem ser observados na Tabela 2 e na Figura 1. Observa-se na Tabela 2 que a melhor combinação foi de 0,5 mg/L de AIA mais 1,0 mg/L de BAP produzindo um número médio de oito folhas por explante. Com o aumento das concentrações de AIA a partir de 0,5 mg/L houve diminuição no número de folhas para todas as combinações de BAP. Estes resultados mostram que para indução e formação de folhas, foi necessária a presença dos reguladores de crescimento num balanço adequado entre estes.

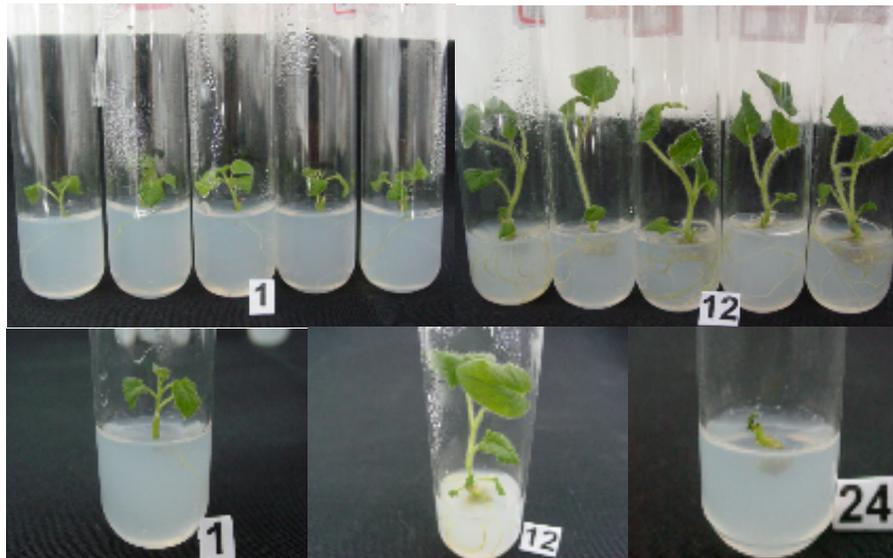


Figura 1 – Plântulas de cubiu sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 12 (1,0 de BAP + 0,5 de AIA); tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA). UFAM – Manaus/AM, 2005.

Araújo *et al* (2004) estudando a multiplicação *in vitro* de gloxínia obteve a melhor resposta para o número médio de folhas (13 folhas por explante) usando apenas a citocinina BAP na concentração 1,77 mg/L, segundo este autor a redução do número de folhas com o aumento das concentrações de BAP, pode ser atribuído ao fato deste regulador estimular a formação de maior número de brotos, porém de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas. No presente trabalho, a combinação de reguladores de crescimento, além de ter proporcionado maior número de folhas, proporcionou um desenvolvimento mais vigoroso destas quando comparadas com o tratamento testemunha (Figura 1), ou seja, tratamento contendo 0,0 mg/L de AIA mais 0,0 mg/L de BAP, no qual este apresentou plântulas pouco desenvolvidas e com aspecto de frágil. O tratamento contendo interações de AIA e BAP com as respectivas concentrações 2,0 mg/L e 5,0 mg/L (Figura 1) tiveram o pior efeito na indução e formação de folhas provavelmente essas dosagens provocaram um efeito tóxico que, segundo Grattapaglia e Machado (1998), caracteriza-se por

engrossamento exagerado do caule, falta de alongamento e redução no tamanho das folhas, reforçando o exposto por Araújo *et al* (2004). Estes resultados demonstram que a espécie em estudo apresentou comportamento diferenciado quando comparada com o de outras espécies do mesmo gênero, como no caso da batata, que segundo Grattapaglia e Machado (1998), apresenta naturalmente uma grande capacidade de formação de folhas e rápido alongamento do caule, sendo desnecessário o uso de reguladores de crescimento para a quebra de dormência de suas gemas, resultando em ótimas taxas de multiplicação pela simples subdivisão do caule em diversos segmentos nodais contendo uma gema axilar. Sato *et al* (2001) obtiveram em torno de seis folhas em tratamentos sem BAP. Além disso, foi observado que estas folhas não apresentaram deformidades o que não aconteceu com os tratamentos que continham a citocinina BAP no meio de cultura para mandioca. Segundo os mesmos autores a importância de se obter maior número de folhas da mandioca, está no fato da multiplicação desta espécie *in vitro* ser feita através das repicagens das gemas foliares, ou seja, cada folha representa uma gema e esta uma nova plântula.

4.3 Número médio de brotações

A análise de variância para o número médio de brotações encontra-se na Tabela 3 e mostra que houve diferença significativa a nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F, entre as diversas concentrações de AIA e BAP, assim como para a interação destes fatores.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio
AIA	4	0,33*
BAP	4	2,96*
Interação (AIA x BAP)	16	0,76*
Blocos	3	0,05n.s.
Resíduo	72	0,06
CV (%)		18,74

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações na indução e regeneração do número médio de brotos. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da contagem do número de brotos. UFAM – Manaus/AM, 2005.

* significativo ao nível de 1% de probabilidade.
n.s. não significativo.

Concentrações de AIA em mg/L	Tratamentos		Brotações
	Concentrações de BAP em mg/L		
0,0	0,0	0,0	1,0 c
		0,5	1,05 bc
		1,0	1,30 bc
		3,0	2,10 a
		5,0	1,39 b
0,5	0,0	0,0	1,20 b
		0,5	1,00 b
		1,0	1,25 b
		3,0	3,10 a
		5,0	1,25 b
1,0	0,0	0,0	1,10 b
		0,5	1,25 b
		1,0	1,00 b
		3,0	1,95 a
		5,0	1,10 b
2,0	0,0	0,0	1,10 b
		0,5	1,00 bc
		1,0	1,50 a
		3,0	1,80 a
		5,0	0,70 c
3,0	0,0	0,0	0,95 b
		0,5	1,80 a
		1,0	2,00 a
		3,0	1,10 b
		5,0	1,10 b

Tabela 4 – Teste de Tukey do número médio de brotos por explante do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de significância de 5%. UFAM – Manaus/AM, 2005.

Os efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP podem ser observados na Tabela 4 e na Figura 2. Observa-se que a melhor combinação dos reguladores de crescimento foi de 0,5 mg/L de AIA mais 3,0 mg/L de BAP produzindo um número médio de 3,1 brotos por explante. Estes resultados corroboram o exposto por Skoog e Miller (1957), no qual estes autores afirmaram que o desenvolvimento da parte aérea é determinado pelo balanço entre auxina e citocinina.

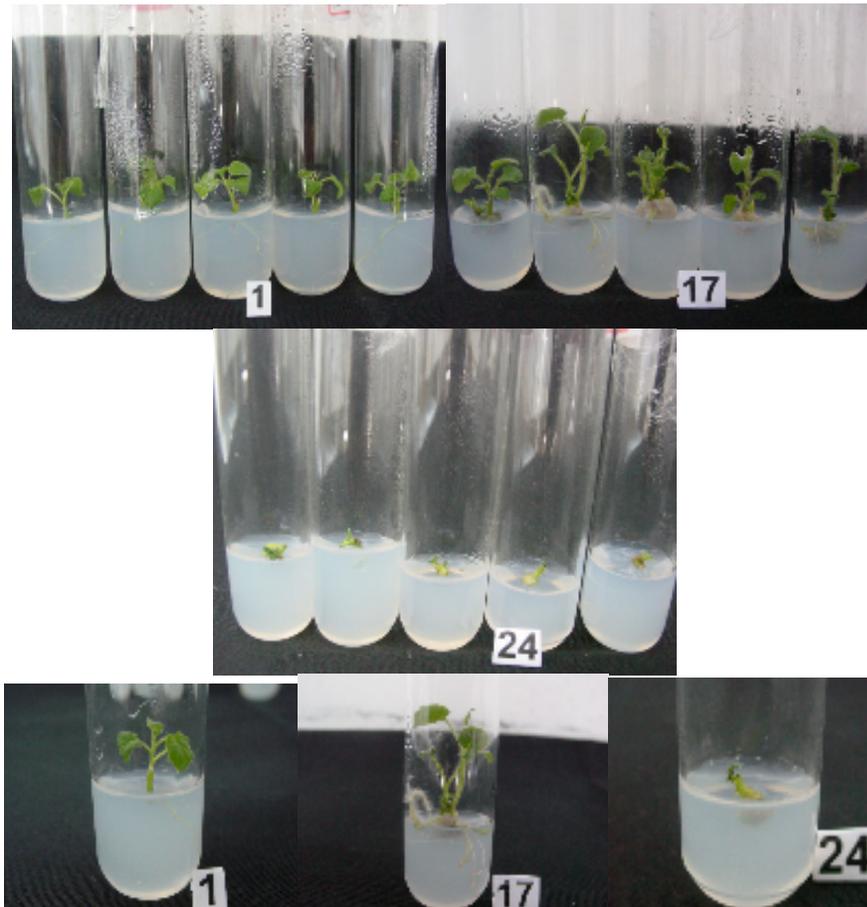


Figura 2 – Plântulas de cubiu sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 17 (3,0 de BAP + 0,5 de AIA); tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA). UFAM – Manaus/AM, 2005.

Segundo Pasqual *et al* (1997c) e Cid (2000), para a obtenção de multiplicação de brotações são requeridas baixas concentrações de auxina combinadas com alto níveis de citocinina, no entanto, em alguns casos, a citocinina sozinha é suficiente. De acordo com Pasqual *et al* (1997c) a adição destes reguladores de crescimento estimula a divisão celular e controla a morfogênese, reduzindo a dominância apical e liberando gemas laterais da dormência. Os resultados deste trabalho estão de acordo com os obtidos por diversos autores. Costa *et al* (2000) estudando regeneração *in vitro* de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) obteve melhores respostas em meio de cultura contendo a combinação de

0,2 mg/L de AIA mais 2,5 mg/L de BAP. McCormick *et al* (1986), Tan *et al* (1987) e Patil (1994) observaram que a combinação adequada de auxinas e citocininas no meio de cultura proporcionou um aumento na frequência de regeneração, em comparação aos meios suplementado apenas com citocinina. Ohki *et al* (1978) verificando o efeito positivo da combinação destes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de *L. esculentum*, sugeriram que esse efeito pode ser causado pela maior habilidade das células dessa espécie em utilizar e adaptar-se a combinação de auxinas e citocininas, de que a citocinina somente. Borges Junior (2004) obteve na multiplicação *in vitro* de *Acácia mearnsii* numa taxa de 3,5 de gemas axilares por explante utilizando a concentração de 2 mg/L de BAP, e cita Correia e Graça (1995), os quais obtiveram resposta semelhante com AIB 0,05 mg/L e BA a 2 mg/L. Huang *et al* (1993) tiveram como resposta usando AIB a 0,01 mg/L e BAP a 2 mg/L duas gemas por explante e verificaram que a citocinina BAP foi mais eficiente que a cinetina. Frota *et al* (2004) ao estudar regeneração *in vitro* de *Opuntia ficus-indica* afirmam que a melhor resposta na indução de brotos, foi favorecida pelas concentrações de 0,25 mg/L de AIA mais 2 mg/L de BAP. Já Paiva *et al* (1997) e Araújo *et al* (2004) obtiveram maior número de brotos usando apenas a citocinina BAP com as respectivas concentrações 2 e 2,25 mg/L em explantes de *Sinningia speciosa*. Mello-Farias *et al* (1996) também utilizando somente BAP a 2 mg/L obtiveram maior taxa de multiplicação (4,46 brotos por explante). Estes resultados sugerem que a citocinina BAP é de fundamental importância no meio de multiplicação e que concentrações pequenas da auxina AIA são requeridas num balanço adequado para indução e regeneração *in vitro* de brotos de várias espécies incluindo a de *Solanum sessiliflorum*, e que dependendo da espécie essa resposta pode variar. Os demais tratamentos deste trabalho não diferenciaram entre si, no entanto a partir da concentração 0,5 mg/L de AIA há diminuição na resposta para todas as outras variáveis estudadas, sendo que no caso da indução e regeneração de brotações quando a concentração da auxina AIA é aumentada para 3,0 mg/L juntamente

com as concentrações 0,5 e 1,0 mg/L de BAP houve uma tendência a aumentar o número de brotos, este resultado contrapõe-se ao exposto por Cid (2000), Torres (1997) e Grattapaglia e Machado (1998), os quais afirmam que a relação citocinina/auxina alta favorece a indução de partes aéreas e não o contrário. Talvez este comportamento seja reflexo da resposta do explante à sua própria idade fisiológica e ou a fatores do ambiente tais como luz, temperatura, gás carbônico e oxigênio ou ainda de hormônios endógenos que possam ter interagido com os reguladores exógenos (PASQUAL *et al*, 1997a; 1997c; GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998). É importante ressaltar que o AIA é uma auxina termo-sensível, e foi adicionada ao meio antes da autoclavagem. Esse fato pode ter contribuído para que doses mais elevadas desse regulador possa ter interagido com a citocinina e ter produzido efeito fisiológico perceptível. As dosagens de 2,0 mg/L de AIA com 5,0 mg/L de BAP promoveram o pior resultado reforçando o exposto por Qi-Guang *et al* (1986) os quais afirmam que o excesso de BAP é tóxico, inibiu a brotação de gemas e reduziu drasticamente o número de partes aéreas por explante em cultura de *Castanea mollissima*.

4.4 Altura média das brotações

A análise de variância para a altura média das brotações encontra-se na Tabela 5 e mostra que houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F, entre as diversas concentrações de AIA e BAP, assim como para a interação destes fatores.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio
AIA	4	19,44*
BAP	4	49,30*
Interação (AIA x BAP)	16	3,96*
Blocos	3	1,52n.s.
Resíduo	72	0,65
CV (%)		20,65

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações sobre a altura média dos brotos. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da medida em cm dos brotos. UFAM – Manaus/AM, 2005.

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.
n.s. não significativo

Concentrações de AIA em mg/L	Tratamentos		Altura Brotações
	Concentrações de BAP em mg/L		
0,0	0,0		3,10 a
	0,5		1,81 b
	1,0		2,37 ab
	3,0		3,04 a
	5,0		1,31 b
0,5	0,0		6,22 a
	0,5		5,62 a
	1,0		6,50 a
	3,0		4,17 b
	5,0		2,41 c
1,0	0,0		4,33 b
	0,5		5,42 ab
	1,0		5,55 a
	3,0		4,07 bc
	5,0		1,57 d
2,0	0,0		4,22 b
	0,5		6,35 a
	1,0		6,25 a
	3,0		3,92 b
	5,0		0,65 c
3,0	0,0		2,84 b
	0,5		5,9 a
	1,0		6,2 a
	3,0		3,05 b
	5,0		0,99 c

Tabela 6 – Teste de Tukey da altura média de brotos do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de significância de 5%. UFAM – Manaus/AM, 2005.

Os efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP podem ser observados na Tabela 6 e na Figura 3. A combinação que promoveu maior altura média dos brotos, cujas doses foram 0,5 mg/L de AIA mais 1,0 mg/L de BAP produzindo a altura média de 6,5 cm nos brotos não diferiu estatisticamente dos tratamentos de concentrações 2,0 mg/L de AIA mais 0,5 mg/L de BAP (com altura média de 6,3 cm) e 0,5 mg/L de AIA mais 0,0 mg/L de BAP (com altura média de 6,2 cm).

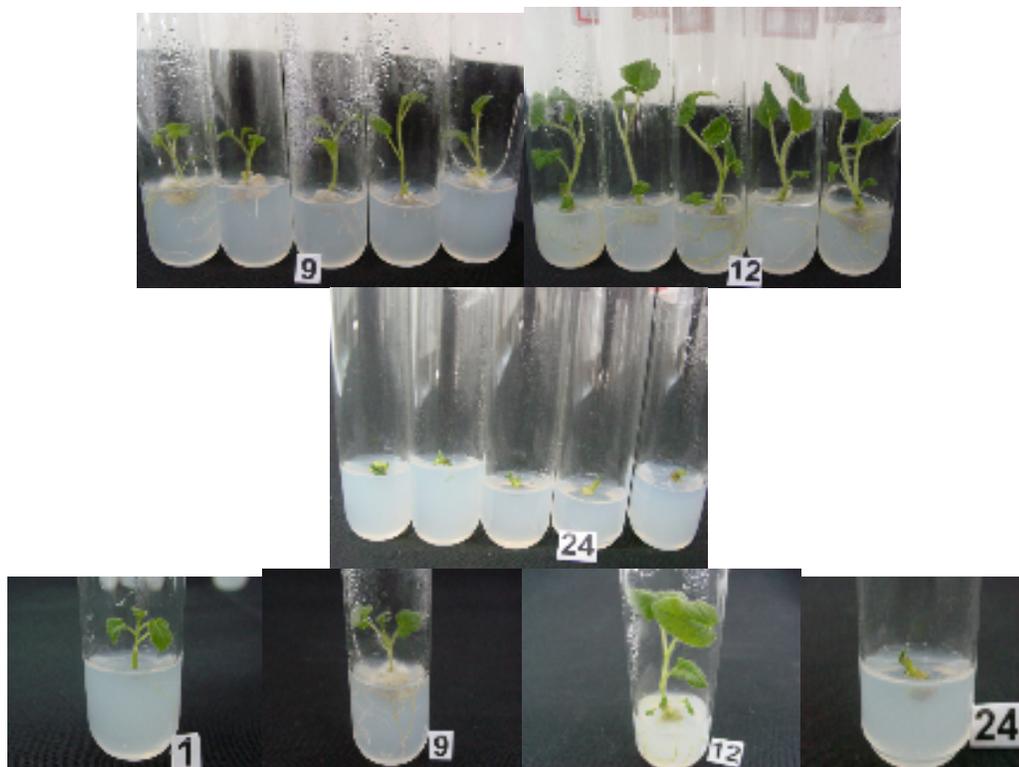


Figura 3 – Plântulas de cuiú sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 9 (0,5 de BAP + 2,0 de AIA); tratamento 12 (1,0 de BAP + 0,5 de AIA) e tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA). UFAM – Manaus/AM, 2005.

Porém de acordo com Oliveira e Cabral (1998) a altura adequada para a aclimatização de plântulas produzidas *in vitro* seria de 4 cm ou valores próximos a este. Valor semelhante foi obtido neste trabalho, na presença de citocinina e auxina num balanço respectivo de 0,5 mg/L de AIA mais 3,0 mg/L de BAP, essa mesma combinação de AIA e BAP coincidiu com o melhor tratamento contendo maior número médio de brotações. Essa concentração de BAP foi considerada alta quando comparada a de outros autores. De acordo com Frota *et al* (2004), as concentrações de 0,25 mg /L de AIA mais 0,50 mg/L de BAP favoreceram o crescimento de brotos de palma forrageira, já Borges Júnior *et al* (2004) obteve resultados contrários ao testar o efeito de várias citocininas em gemas axilares de *Acácia mearnsii*, onde a BAP foi a que mais destacou a redução do alongamento das gemas com o aumento da concentração

deste regulador, o mesmo ocorreu na cultura de tecido de *Acacia mimosa* quando a concentração de BAP passou de 0,5 mg/L para 1 mg/L (RUFFONI *et al*, 1992). Yui *et al* (1990) ao testar o efeito de diversas concentrações de giberelinas em macieira, observou que estas foram dispensáveis para boa multiplicação e alongamento dos brotos. Sato *et al* (2001), ao estudar micropropagação da mandioca, observou que na presença de BAP o valor do comprimento da parte aérea foi de 1,55 cm, enquanto que sem o BAP a resposta foi de 19,11 cm. Araújo *et al* (2004) na multiplicação *in vitro* de gloxínia observaram uma redução do tamanho de brotos com o aumento das concentrações de BAP, segundo este, diversos autores têm observado os mesmos resultados negativos desse regulador de crescimento no alongamento das brotações em espécies como crisântemo e morangueiro. Este comportamento confirma o exposto por Pasqual *et al* (1997c), onde os mesmos afirmam que altas taxas de citocinina podem reduzir o tamanho das brotações.

4.5 Número médio de raízes

A análise de variância para o número médio de raiz encontra-se na Tabela 7 e mostra que houve diferença significativa a nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F, entre as diversas concentrações de AIA e BAP, assim como para a interação destes fatores.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio
AIA	4	54,33*
BAP	4	119,24*
Interação (AIA x BAP)	16	8,85*
Blocos	3	0,68n.s.
Resíduo	72	1,82
CV (%)		33,77

Tabela 7 – Resumo da análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações sobre indução e regeneração do número médio de raiz. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da contagem do número de raiz. UFAM – Manaus/AM, 2005.

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.
n.s. não significativo.

Tratamentos		Raiz
Concentrações de AIA em mg/L	Concentrações de BAP em mg/L	
0,0	0,0	2,30 a
	0,5	1,20 a
	1,0	1,25 a
	3,0	0,85 ab
	5,0	0,15 b
0,5	0,0	3,15 c
	0,5	6,15 b
	1,0	8,45 a
	3,0	6,65 ab
	5,0	2,45 c
1,0	0,0	3,25 b
	0,5	7,65 a
	1,0	8,10 a
	3,0	4,45 b
	5,0	0,40 c
2,0	0,0	2,65 b
	0,5	7,65 a
	1,0	7,90 a
	3,0	3,75 b
	5,0	0,25 c
3,0	0,0	2,50 b
	0,5	7,17 a
	1,0	8,15 a
	3,0	3,25 b
	5,0	0,35 c

Tabela 8 – Teste de Tukey do número médio de raízes do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal.). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de significância de 5%. UFAM – Manaus/AM, 2005.

Os efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP podem ser observados na Tabela 8 e na Figura 4. Estes resultados mostram que para a obtenção de maior número de raízes na indução e regeneração *in vitro* de brotações do cubiu, foi necessária a presença de citocinina e auxina num balanço respectivo de 0,5 mg/L de AIA mais 1,0 mg/L de BAP produzindo 8,45 raízes. Segundo Nagao (1993), a formação de um sistema radicular bem definido é de extrema importância para sobrevivência e o crescimento das plântulas nas novas condições do ambiente. Pasqual *et al* (1997c) afirmam que a concentração de 1,0 mg/L da citocinina BAP é considerada alta e pode inibir ou atrasar a formação de raízes.

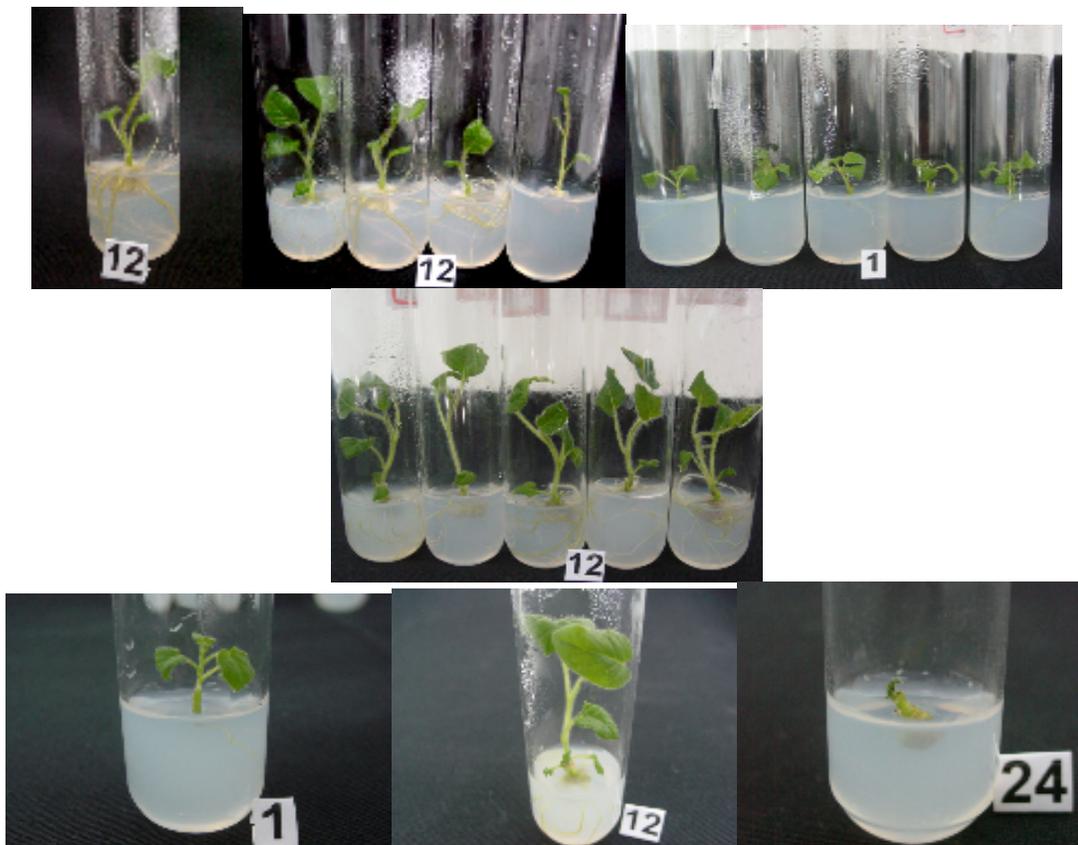


Figura 4 – Plântulas de cuiú sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 12 (1,0 de BAP + 0,5 de AIA) e tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA). UFAM – Manaus/AM, 2005.

No entanto, através deste trabalho, foi possível observar que o sinergismo entre esses reguladores de crescimento nas referidas concentrações, favoreceu um aumento no número médio de raízes. De acordo com Barcelo Coll *et al* (1988) *apud* Barboza *et al* (2004) durante a rizogênese, o crescimento acelerado das raízes *in vitro* pode retardar o crescimento da parte aérea, pois o crescimento ativo do sistema radicular necessita de substâncias orgânicas translocadas da parte aérea para a base, comprometendo assim o desenvolvimento do caule e das folhas, o que não aconteceu neste trabalho, no qual foi possível obter ao mesmo tempo através dessas concentrações de AIA e BAP maior número médio de raiz (8,45) assim como também maior altura média (6,5 cm) e maior número médio de folhas (8,0) de brotos do

cubiu. A interação dessas concentrações desses reguladores de crescimento mostra-se interessante, pois proporcionou a obtenção de plântulas completas, ou seja, ideais para serem transferidas diretamente para um substrato e conseqüentemente serem aclimatizadas, sem precisarem passar por uma fase de alongamento e ou posteriormente de enraizamento (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998; PASQUAL *et al*, 1997a). O resultado deste trabalho reforça a idéia de quanto é importante um ajuste para manter um equilíbrio auxina e citocinina para obtenção de plantas cultivadas *in vitro* (GONZÁLEZ *et al*, 2004). Sato *et al* (2001) utilizando somente a citocinina BAP a 2 mg/L verificou que além ter promovido a indução de brotações curtas, esta inibiu o enraizamento em plântulas de mandioca. Já Pasqual (1985) *apud* Nagao (1993) obteve melhores resultados no enraizamento de brotações de gemas axilares de “valência” com a auxina ANA a 5 mg/L mais a citocinina BAP a 0,1 mg/L.

4.6 Comprimento médio das raízes

A análise de variância para o comprimento médio das raízes encontra-se na Tabela 9 e mostra que houve diferença significativa a nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F, entre as diversas concentrações de AIA e BAP, assim como para a interação destes fatores.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio
AIA	4	26,06*
BAP	4	71,77*
Interação (AIA x BAP)	16	2,98*
Blocos	3	1,32n.s.
Resíduo	72	0,52
CV (%)		22,70

Tabela 9 – Resumo da análise de variância para o efeito das diferentes concentrações de AIA e BAP e suas interações sobre o comprimento médio das raízes. Plantas avaliadas aos 43 dias após a inoculação em meio de cultura através da medida em cm das raízes. UFAM – Manaus/AM, 2005.

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.
n.s. não significativo.

Tratamentos		Comprimento Raiz
Concentrações de AIA em mg/L	Concentrações de BAP em mg/L	
0,0	0,0	5,45 a
	0,5	1,16 b
	1,0	1,26 b
	3,0	0,90 bc
	5,0	0,12 c
0,5	0,0	6,75 a
	0,5	5,87 a
	1,0	6,42 a
	3,0	4,00 b
	5,0	1,21 c
1,0	0,0	6,20 a
	0,5	4,80 b
	1,0	4,40 b
	3,0	2,40 c
	5,0	0,32 d
2,0	0,0	5,17 a
	0,5	2,77 c
	1,0	4,02 b
	3,0	2,90 c
	5,0	0,07 d
3,0	0,0	3,86 b
	0,5	3,02 bc
	1,0	4,25 ab
	3,0	2,02 c
	5,0	0,40 d

Tabela 10 – Teste de Tukey do comprimento médio das raízes do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal.). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si no nível de significância de 5%. UFAM – Manaus/AM, 2005.

a

de comprimento médio de que o maior comprimento médio de raiz foi obtido com 0,5 mg/L de

AIA na ausência de BAP, produzindo 6,75 cm. No entanto, segundo Oliveira e Cabral (1998), comprimento de raiz maior que 3,0 cm não é interessante para o transplântio de plântulas, e sim resultados que fiquem próximo desse valor, os quais também foram obtidos com as concentrações de 0,5 mg/L de AIA mais 3,0 mg/L de BAP (4,0 cm) e 0,5 mg/L de AIA mais 0,5 mg/L de BAP (5,87 cm), sendo que no primeiro caso, apesar desta combinação de concentra-

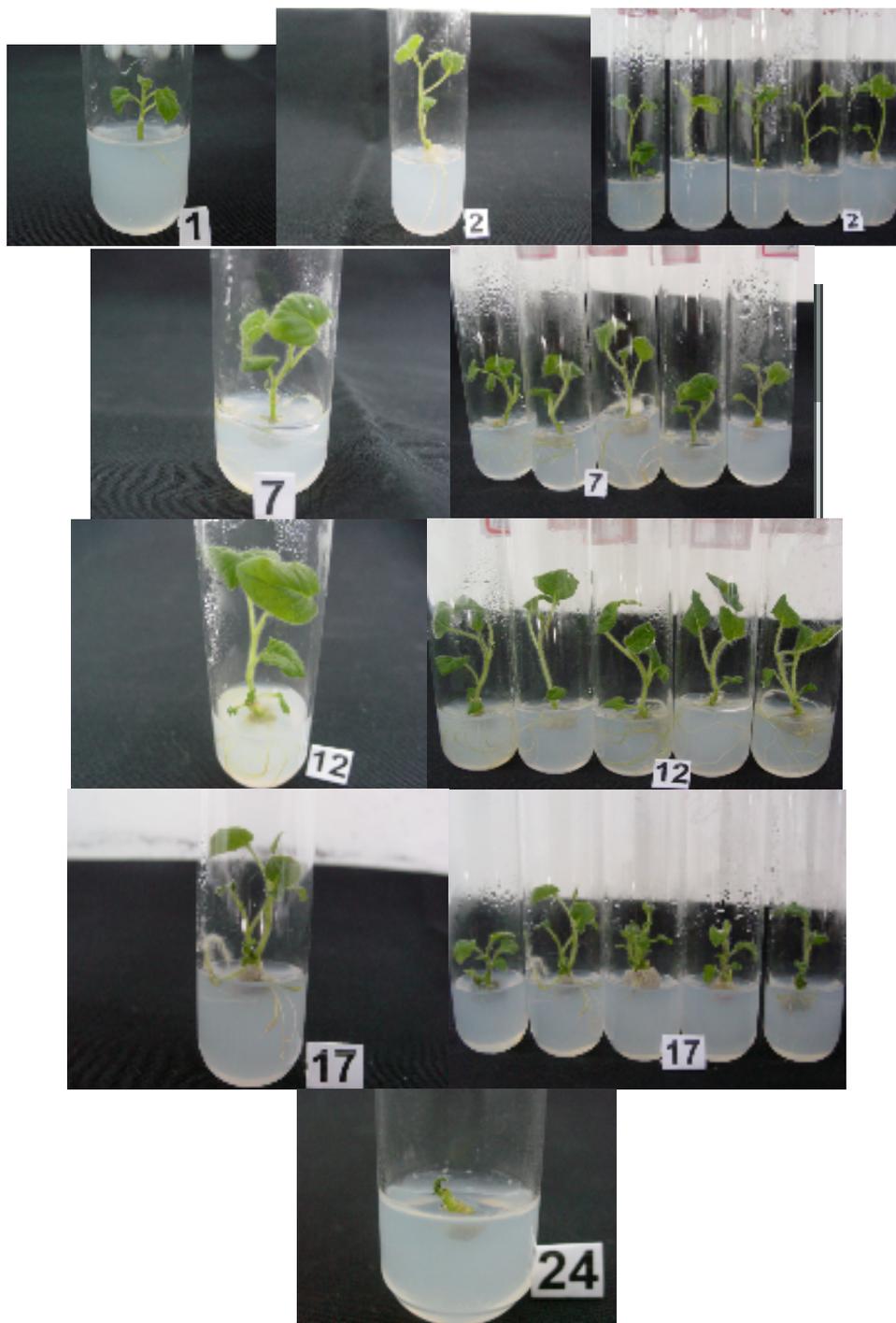


Figura 5 – Plântulas de cuiú sob efeitos das interações entre os fatores AIA e BAP em mg/L: tratamento 1 (sem regulador de crescimento); tratamento 2 (0,0 de BAP + 0,5 de AIA); tratamento 7 (0,5 de BAP + 0,5 de AIA); tratamento 17 (3,0 de BAP + 0,5 de AIA) e tratamento 24 (5,0 de BAP + 2,0 de AIA). UFAM – Manaus/AM, 2005.

ção de reguladores de crescimento ter proporcionado melhor comprimento de raiz, não é indicado para esta variável, uma vez que também promoveu o maior número de brotações.

Portanto esta última combinação, ou seja, 0,5 mg/L de AIA e 0,5 mg/L de BAP prevaleceu como a melhor combinação para o comprimento de raiz considerando que também promoveu plântulas com boa quantidade no número médio de raiz assim como boa altura para o transplântio das mesmas, porém, este tratamento não diferiu estatisticamente do tratamento com as combinações de 0,5 mg/L de AIA mais 1,0 mg/L de BAP, que sobressaiu-se por ter tido melhor altura média, maior número médio de raiz e maior número médio de folhas, sendo ideal para a aclimatização. Estes resultados mostram que para a indução e regeneração *in vitro* de plântulas de cubiu com comprimento adequado de raiz para aclimatização, foi necessária a presença de citocinina e auxina num balanço próximo do ideal de 0,5 mg/L de AIA mais 0,5 mg/L de BAP e ou 0,5 mg/L de AIA mais 1,0 mg/L de BAP. Nas primeiras fases da rizogênese, ou seja, na indução e iniciação, é necessária a presença de auxina, no entanto este regulador de crescimento é inibitório para o alongamento das raízes. Isso pode explicar o fato de que mesmo em combinação com as varias concentrações de BAP, a menor quantidade de concentração de auxina (0,5 mg/L) promoveu melhores resultados para o comprimento médio de raiz para todos os tratamentos, com tendência a diminuir o valor desta variável a partir dessa concentração, independente da combinação de BAP. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) a dificuldade num sistema de micropropagação está em determinar uma condição *in vitro* na qual todas essas fases possam ocorrer normalmente e de preferência sem demandar manipulação adicional de um a fase para outra. Segundo este autor, o tipo de sistema radicular obtido no enraizamento *in vitro* também determina o sucesso do transplântio e as raízes quanto mais curtas são preferíveis, pois facilitam a lavagem e retirada do meio de cultura aderido, assim como a introdução da planta no substrato. Conforme Paiva *et al* (2004) algumas espécies dispensam a utilização de reguladores de crescimento de raiz no estabelecimento *in vitro*, como no caso de *Strelitzia reginae* no qual o desenvolvimento radicular ocorreu independente da presença de BAP no meio de cultura, não havendo

diferença no comprimento de raízes em função das diferentes concentrações utilizadas. Já Barbosa *et al* (2004) constataram que na presença somente da auxina ANA, o sistema radicular desenvolvido, apresentou raízes de menor comprimento, mais uniformes em relação ao formado em meio de cultura sem reguladores que apresentaram raízes finas ramificadas e longas, estes também verificaram que na interação da citocinina cinetina a 2,0 mg/L mais a auxina ANA a 1,0 mg/L foi promovido comprimento variado e apresentaram-se mais enoveladas, no entanto com a redução da concentração de ANA para 0,5 mg/L, ocorreu a formação de raízes curtas e quebradiças.

5 CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível micropropagar a espécie *Solanum sessiliflorum* Dunal adicionando-se ao meio MS reguladores de crescimento, havendo um balanço adequado entre a auxina AIA e a citocinina BAP para indução e regeneração *in vitro* de brotações e enraizamento do cubiu. As combinações das concentrações de AIA e BAP que proporcionaram melhores resultados para o desenvolvimento de partes aéreas e raízes foram:

- a) Para folhas 0,5 mg/L de AIA mais 1,0 mg/L de BAP produzindo número médio de 8 folhas por explante;
- b) Para brotações 0,5 mg/L de AIA mais 3,0 mg/L de BAP produzindo número médio de 3,10 brotos por explante;
- c) Para altura das brotações 0,5 mg/L de AIA mais 3,0 mg/L de BAP promovendo altura média de 4,17 cm;
- d) Para raízes 0,5 mg/L de AIA mais 1,0 mg/L de BAP produzindo número médio de 8,45 raízes;
- e) Para o comprimento da raiz 0,5 mg/L de AIA mais 1,0 mg de BAP promovendo comprimento médio de 6,4 cm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO, P. V. Embryogênese. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, p. 82-123, 1983.

ARAÚJO, A. G.; FIORINI, C. V. A.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; VILLA, F. Multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* LOO. HIERN.). Revista Ceres, 51 (293): 117 - 127, 2004.

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZAL, A. C.. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. Pesq. Agropec. Brasília, v. 39, n. 8, p. 725-733, ago.2004.

BARCELÓ, C. J.; NICOLÁS, R. G.; SABATER, G. B.; SÁNCHEZ T. R. Fisiologia Vegetal. 6. ed. Madri:Pirâmide, 662 p., 1988.

BORGES JUNIOR, N.; SOBORSA, R. C.; MARTINS-CODER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia negra (*Acácia mearnsii* De Wild.). R. Árvore, Viçosa-MG, v. 28, n. 4, p.493-498, 2004.

BRÜCHER, H. Plant Genetics and development in tropical zones. Applied Sciences and Development. 2:85-95, 1968.

CARDOSO, M. O. Hortaliças Não-Convencionais da Amazônia. Brasília: Embrapa, 1997. 150 p.

CID, L. P. B. Cultura de tecidos vegetais – uma ferramenta fundamental no estudo da biologia moderna de plantas. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, nº. 31, p.16-21 2003.

CID, L. P. B. Introdução aos Hormônios Vegetais. Brasília: Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 179 p.

CID, L. P. B. Relatório de estágio sobre cultura de dendê (*Elalis guineensis* J) Manaus, 1985, 20 p.

CLEMENT, C. R. A center of crop genetic diversity in Western Amazonia: a new hypothesis of indigenous fruit-crop distribution. *BioScience*, vol. 39, n. 9, p. 624-628, 1989.

COSTA, M. G.; NOGUEIRA, F. T.; OTONI, W. C.; BROMMONSCHENKEL. Regeneração *in vitro* de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) industrial IPA-5 e IPA-6. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 24, n 3, p. 671-678, jul./set., 2000. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 31, p.16-21 2003.

COUCEIRO, M. A.; SIQUEIRA, D. L.; PEREIRA, W. E.; NEVES, L. L. M. Crescimento de explante *in vitro* e de mudas de bananeira cv. Maçã submetidas a doses de sacarose nas fases de enraizamento e aclimação. *Revista Ceres, Viçosa*, v. XLVIII, n. 280, p. 615-627, nov./dez., 2001.

COUTURIER, G. Alguns insetos do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal var. *sessiliflorum* Dunal, Solanaceae) na região de Manaus – AM. *Acta Amazônica*, 18(3-4): 93-103, 1988.

CRONQUIST, A. Na integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York. Botanical Garden. USA, 1262p, 1981.

D'ARCY, W. G. Flora of Panama. Fam. 170 Solanaceae. *Ann Missouri Bot. Gard.*, 60(3): 573-580, 1973.

EMBRAPA. Recursos Genéticos e Biotecnologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2002. 6 p.

FÁRI, M.; RSENDE, G. M.; MELO, N. F. Regeneração *in vitro* de tomate industrial visando a transformação genética. In: Encontro de Genética do Nordeste. *Anais. Maceió*, v. 12, p. 128, 1997.

FARIA, R. T.; ILLG, R. D. Introgressão da capacidade de regeneração de plantas *in vitro* no tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal. *Anais. Brasília:REDBIO*, v. 1, p. 102, 1993.

FROTA, H. M.; CARNEIRO, M. S. S.; ZARATE, R. M. L.; CAMPOS, F. A. P.; PEIXOTO, M. J. A. Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento *in vitro* de brotos de dez clones de palma forrageira. *Revista Ciência Agronômica*, vol. 35, numero especial, p. 279-283, out., 2004.

GONZÁLES, S. R.; LOZANO, J. G.; ROJAS, M. A. Propagacion Asexual de Plantas: Conceptos Básico y Experiencias com Espécies Amazónicas. Colômbia: Produccion Editorial Produmedios, 2004. 55p.

GOULART, L. H. S. D. Dicionário do Agrônomo. Editora Rigel, 1991, 170 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres, A. C., Caldas, L. S. & Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília : Embrapa, v.1, p.183-260, 1998.

HEISER JUNIOR, C. B. The relationships of the Naranjilla, *Solanum quitoense*. Biotropica 4 (2): 77-84, 1972.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, p. 117-227, 1983.

HUANG, F. H.; AL-KHAYRI, JM.; GBUR, E. F. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. In *vitro*. Cell Development of Biology, v. 30, p. 70-74, 1993.

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M.; DUTRA, L. F. Micropropagação do cafeeiro com concentrações de BAP em meio de pré-cultivo e de BAP e TDZ em meio de subcultivo. Revista Ceres, Lavras, v. XLIX, n. 283, 2002.

KITTO, S. L. Comercial micropropagation. Hort Science, v. 32, n. 6, p. 1012-1013, October, 1997.

KRIKORIAN, A. D., O'CONNOR, S. A.; FITTER, M. S. Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and culture derived plants. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, p. 541-581, 1983.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS O. F.; MENEZES, I. C.; PINTO, J. E. B. P. Cultura de Tecidos (manual). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Belém: Embrapa, 2000. 41 p.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; MOURA E.; MENEZES, I. C.; Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Belém: Embrapa, 2000. 15p.

MELCHERS, G; SACRISTAN, M. D.; HOLDER, A. A. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun*, 43:203-218, 1978.

MELO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta enxerto de pereira, “Old Home” x “Farmingdale” 9. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 2, n. 2, p. 71-78, maio/agosto, 1996.

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. 5th ed. United States of America: Editor John Wiley & Sons, 2001. 684 p.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual review of plant physiology*. V. 25, p.135-166, 1974.

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

NAGAO, E. O. Efeitos da Sacarose, Nitrogênio Inorgânico e Ácido Indol Butírico na Propagação *in vitro* do Porta-Enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. 1993, 56f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

NUNES, H. C. B. Micropropagação de espécies. Disponível em: <http://www2.uepa.br/tecnagro/isetec/minicursos/micropropagação_de_especies.htm>. Acesso em: janeiro 2005.

OHKI, S.; BIGOT, C.; MOUSSEAU, J. Analysis of shoot-forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids. *Plant Cell Physiology*, Tokyo, v. 19, p. 27-42, 1978.

OLIVEIRA, R. P. CABRAL, J. R. S. Protocolo para produção comercial de mudas de abacaxizeiro em laboratório de cultura de tecidos. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF (Biotecnologia em Foco), 3 p., 1998.

PAHLEN, A. V. D. Cubiu [*Solanum Topiro* (Humb. & Bonpl.)], uma fruteira da Amazônia. *Acta Amazônica*. Manaus, 7(3): 301 a 307. 1977.

PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M.; PAIVA, L. V. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). *Ciênci. Agrotec.*, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1031-1037, set/out., 2004.

PAIVA, W. O. Taxa de polinizaçãocruzada em cubiu. Pesquisa Agropecuária Brasileira. V. 34. n. 1, p. 145-149, jan, 1999.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; FINOTTI, D. R.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina ‘Poncã’: concentrações do meio MS e da sacarose. Revista Ceres, Lavras, v. XLIX, n. 282, p. 181-189, 2002.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. Cultura de Tecidos: Tecnologia e Aplicações – Introdução: Fundamentos Básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997a. 159 p.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D.; A.; CARVALHO, G. R. Cultura de Tecidos: Tecnologia e Aplicações – Aplicações no Melhoramento Genético de Plantas. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997b. 123 p.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. Cultura de Tecidos: Tecnologia e Aplicações – Meios de Cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997c. 127 p.

PATIL, R. S. Genetic manipulation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crop improvement. Nottingham : University of Nottingham, (Ph.D. Thesis), 253 p., 1994.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. Pesq. Agropec. Brasi., Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035 – 1043, set., 2003.

PUGA, N. T.; NASS, L. L.; AZEVEDO, J. L. Glossário de Biotecnologia Vegetal. São Paulo: Editora Manole LTDA, 1991, 87 p.

PURCELL, C. M. Chromosome number of cubiu, *Solanum sessiliflorum* Dunal, Solanaceous fruit of the Brazilian Amazonas. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico., p. 247-251, 1964.

QUI-GUANG, Y.; READ, P. E.; FELLMAN, C. D.; HOSIER, M. A. Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*. HortScience v. 21, p. 133-134, 1986.

RUFONI, B. et al. Micropropagation of *Acacia* “mimosa”. Acta Horticultural, n. 300, janeiro, p. 95-102, 1992.

SÁ, M. E. L.; BRAGA, M. F. Avaliação de protocolo para obtenção de mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata-anã (subgrupo AAB). Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal – SP, v. 24, n. 1, p. 236-239, abril, 2002.

SABÁ, R. T.; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, R. P. R. Micropropagação do jaborandi. Hortic. Bras. v. 20, n. 1, p.106-109, mar. 2002.

SALGADO, S. M. L.; CUNHA, R. L.; NIELLA, G. R.; TEIXEIRA, H.; PASQUAL, M. Efeito da utilização de TDZ e benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). Ciênc.Agrotec. , Lavras, v.25, n. 2, p. 274-280, março/abril, 2001.

SALICK, J. Cocona (*Solanum sessiliflorum*) production and breeding potentials of peach-tomato. In: Wickens, N. H; Day, P. New crops for food and industry. Ed. Chapman and Hall. P. 258-264, 1987.

SALICK, J. Crop domestication and the evolutionary ecology of cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal). Evolutionary Biology, volume 26, edited by Max K. echt *et al.* Plenum Press, New York, p. 247-285, 1992.

SATO, A. Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Micropropagação da mandioca: influencia da concentração de nitrato de amônio com e sem BAP. Revista Ceres, Viçosa, v. XLIX, n. 278, p. 405-413, Jul./ago.2001a.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. Cernes, Viçosa, v. 7, n. 2, p.117-123, 2001b.

SCHULTES, R.E.; ROMERO CASTAÑEDA, R.. Edible fruits of *Solanum* in colômbia. Bot. Museum Leaflets. Haward University. Camb. Mass., 19(10):235-286, 1962.

SCHULTES, R. E. Amazônia cultigens and their northward migrations in pre – colômbian times. In: Pre-historic plant migration. Cambridge: Havard University Press. P. 19-38, 1984.

SILVA FILHO, D. F. Variabilidade genética em 29 populações de cubiu (*solanum topiro* humbl. & bonpl. solanaceae) avaliada na Zona da Mata do estado de Pernambuco. UFRPE: Recife, PE. Dissertação de Mestrado. 80 p., 1994.

SILVA FILHO, D. F. Discriminação de Etnovarietades de Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal, Solanaceae) da Amazônia, Com Base em Suas Características Morfológicas e Químicas. 2002, 116f. Tese (Doutorado em Botânica Econômica). Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SILVA FILHO, D. F.; NODA, H.; CLEMENT, C. R. Genetic variability of economic characters in 30 accessions of cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) evaluated in Central Amazonia *Revista Brasileira de Genética*. 16(2):409-417, 1993.

SILVA FILHO, D. F.; ANUNCIÇÃO FILHO, C. J.; NODA, H.; REIS, O. V. Análise multivariada da Divergência Genética em 29 Populações de Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) Avaliada na Zona da Mata no Estado de Pernambuco. *Acta Amazônica*. Manaus, 25(3/4):171 – 180, julho, 1996.

SILVA FILHO, D. F. Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal): Cultivo y utilizacion. Manual técnico. Ministério de Cooperacion Técnica del Reino de los Países Bajos. Secretaria Pro Tempore. Venezuela. 1998. 114 p.

SILVA FILHO, D. F.; ANUNCIÇÃO FILHO, C. J.; NODA, H.; REIS, O. V. Seleção de caracteres correlacionados em cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) empregando a análise de trilha. *Acta Amazônica*, 27(4): 229-249, 1997.

SILVA FILHO, D. F.; MACHADO, F. M. Hortaliças de frutos. In: CARDOSO, M. O. Hortaliças Não-Convencionais da Amazônia. Brasília: Embrapa. p. 97-104, 1997.

SILVA, S. O.; SOUZA, A. S.; PAZ, O. P. Efeito da multiplicação vegetativa *in vitro* na produtividade da batata-doce (*Ipoema batatas* L. Lam). *Rev. Bras. Fisiol. Vegetal*, v. 3, p. 47-51, 1991.

SKOOG, F. MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Journal of Experimental Biology*, v. 11, p. 118-31, 1957.

SMITH, S. M.; STREET, H. E. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Annals of Botany*, v. 38, p. 223-41, 1974.

STORT, E. F. Biologia Floral de *Solanum sessiliflorum* Dun. var. *sessiliflorum*, na região de Manaus, AM. *Acta Amazônica*, 18 (3-4): 55-65, 1988.

TAN, M. M. C.; COLIJN-HOOYMANS, C. M.; LINDHOUT, W. H.; KOOL, A. J. A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 75, p. 105-108, 1987.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. Cultura de Tecido e Transformação Genética de Plantas. 1ª ed. Brasília: Embrapa. 1998, V I, 509 p.

TORRES, A. C. Curso de cultura de tecidos e transformação de plantas. Brasília: Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Ministério da Ciência e Tecnologia. Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia/Escola Brasileira Argentina de Biotecnologia, 1997, 205 p.

TUMA FILHO, E. J. Alternativas Alimentares: Café Rural, Trigo Caboclo e Cubiu. Belém: Emater, 1997. 32 p.

WHALEN, M. D.; COSTICH, D. E.; HEISER, C. B. *Taxonomy of section lasiocarpa*. Gentes Herbarum, 12(2):41-129, 1981.

YUI, E.; CORREA, D. M.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Micropropagação *in vitro* da macieira (*Malus domestica* Borkh.) cultivar “Golden Delicious”. Ciência e prática, 14(1); 56-61, 1990.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P.; MACEDO, S. H. M.; GIOIA, T.; SILVA FILHO, D. F. Composição centesimal de diversas composições de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Estação experimental do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas, INPA. In: Anais do II Simpósio Latino Americano de Ciências do Alimento. Campinas, S. P., Brasil, 1997.

ZEPEDA, C.; SAGAWA, Y. *In vitro* propagation of pineapple. HortScience, v. 16, p. 495, 1981.