



FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO FINAL

1. Identificação do Projeto

Título do Projeto PIBIC/PAIC

**MORFOGÊNESE IN VITRO DE CUBIU EM RESPOSTA À RELAÇÃO
AUXINA/CITOCININA E CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE MS
(1962).**

Orientador

EVA MARIA ALVES CAVALCANTI ATROCH

Aluno

GABRIELLY CORREA BARAUNA

2. Informações de Acesso ao Documento

2.1 Este documento é confidencial?

SIM

NÃO

2.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

SIM

NÃO

2.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

SIM

NÃO

**2.4 Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados?
Especifique.**

3. Introdução

Solanum sessiliflorum Dunal (cubiu) é uma Solanaceae arbustiva que possui uma boa adaptação em diferentes climas e regiões. Seus frutos podem ser aproveitados como sucos, doces, geleias e no preparo de pratos à base de carne, frango e peixes (Silva Filho e Machado, 1997). Além de elevado valor nutritivo (BARBOSA PIRES et al., 2006), os frutos e outras partes da planta são consideradas de valor medicinal na Amazônia (AUGUSTO, 2002). Assim, aplicar ferramentas biotecnológicas a



esta espécie representa ampliar as possibilidades de utilização de um recurso amazônico com interessante potencial mercadológico.

A produção *in vitro* de plantas (micropropagação) representa uma ferramenta biotecnológica de ampla aplicação nas áreas agrícolas e florestal, especialmente quando o objetivo é a produção de uma grande quantidade de plantas em um espaço reduzido, com rapidez, uniformidade e com qualidades fitossanitárias. Ademais permite o estabelecimento das condições necessárias às investigações científicas, que pretendam verificar a influência de variados fatores no desenvolvimento vegetal, em ambiente controlado. Entretanto o sucesso da técnica depende do desenvolvimento de várias etapas que iniciam com as características da planta matriz (fonte de explantes para a cultura *in vitro*), a definição do explante apropriado, de processos de assepsia eficientes e, finalmente, do estabelecimento do propágulo resultando na regeneração de uma planta completa (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Para atender a primeira etapa o mais seguro é produzir a planta matriz *in vitro*, o que poderá ser feito pela germinação de sementes em condições assépticas, especialmente em plantas nativas que ainda não avançaram em programas de melhoramento.

As citocininas são geralmente usadas para quebrar a dominância apical dos brotos, efeito causado pela auxina, e aumentar a taxa de divisão celular. Deste modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais (SRISKANDARAJAH et al., 1982; HU & WANG, 1983). Dentro do grupo das citocininas, o BAP tem sido muito eficiente para induzir a multiplicação em diversas espécies e tende a ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias. (Grattapaglia, D.; Machado, M.).

As auxinas são um hormônio vegetal envolvido em um extraordinária e ampla variedade de mecanismos biológicos e esta ampla atividade suplementada aos meios de cultura auxina foi definida como a competência para estimular processos de expansão, alongamento e divisão celular, com reflexos no enraizamento. Entre elas, o AIB possui grande atividade no enraizamento. (Grattapaglia, D.; Machado, M.).

Segundo FLORES et.al.,1998 para que o calo(massa de células indiferenciadas) seja induzido é necessário, qualquer tecido que tenha capacidade de totipotência ou partes com meristema pode ser utilizado como explante.

Para que ocorra um aumento na produção de calo são necessários vários fatores como o tipo de meio, tipo de explante e condição do ambiente. KIELSE et.al. 2007.



A morfogênese *in vitro* é um processo complexo e ainda não completamente esclarecido. Neste sentido, embora os reguladores de crescimento sejam os fatores mais relevantes no processo, a atividade dos nutrientes minerais permanece pouco investigada (Ramage e Williams, 2002).

Em experimento piloto com segmentos nodais de plântulas de cubiu estabelecidas *in vitro*, verificou-se frequente calogênese em resposta à relação auxina/citocinina. A rapidez com que a planta respondeu aos reguladores sugere ser esta espécie um interessante objeto para estudos de crescimento com variados fatores como os reguladores e os nutrientes minerais, e desta forma se constituindo em um modelo acadêmico para este propósito.

Assim pretende-se avaliar as atividades regulatórias *in vitro* da combinação de AIB (ácido indolil acético) e BAP (benzil aminopurina) e da redução na concentração de nitrogênio, na morfogênese de segmentos nodais e fragmentos foliares de *Solanum sessiliflorum*.

4. Justificativa

Ampliar as possibilidades da aplicação de técnicas biotecnológicas de propagação a um recurso amazônico, e promover a disponibilidade de material propagativo com rápida resposta morfogenética na cultura *in vitro* que possa subsidiar os estudos nos níveis de graduação e pós graduação.

5. Objetivos

Objetivo geral:

Aplicar as técnicas da cultura de tecidos de plantas para promover diferentes rotas morfogenéticas para regeneração de plantas de *Solanum sessiliflorum* *in vitro*, em resposta a tratamentos com reguladores de crescimento e níveis de nitrogênio.

Objetivos específicos:

- Promover calogênese em explantes foliares e de segmentos nodais;
- Promover organogênese em explantes foliares e de segmentos nodais;
- Promover a micropropagação a partir de segmentos nodais;
- Avaliar os efeitos dos reguladores na morfogênese;
- Avaliar os efeitos da diluição do meio de MS (1962) na morfogênese;

6. Metodologia

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do ICB/UFAM. No sentido de estabelecer condições assépticas de trabalho, todos os materiais

utilizados (vidrarias, pinças, cabos de bisturi, placas de Petri, papel filtro, entre outros) e meios de cultura, foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão, por 40 e 15 minutos, respectivamente.

Após inoculação *in vitro* as unidades experimentais foram distribuídas em sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C, fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro, e intensidade luminosa de 2000 LUX, fornecida por lâmpada fluorescente branca fria.

Folhas inteiras obtidas de plântulas *in vitro* foram inoculadas em meio de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) completo e ¼ da concentração dos macronutrientes (1/4 da força) suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de agar com pH ajustado para 5,8. Para estimular calogênese e organogênese adicionou-se aos meios combinações de AIB, ácido indolil butírico, (0, 1, 2 e 3 mg/L) e BAP, benzil amino purina, (0, 1 e 3 mg/L). As culturas foram mantidas em sala de crescimento durante 35 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 12 tratamentos com seis repetições, cada uma delas constituída por um tubo de ensaio. As características consideradas foram a indução de calos (avaliada pela massa fresca), a organogênese destes, avaliada pelo surgimento de raízes e brotações e expressa em porcentagem.

Quadro 1. Combinação das concentrações de AIB e BAP para composição dos tratamentos, em meio de MS completo e ¼ de força dos macronutrientes.

| BAP (mg/L) | AIB (mg/L) | | | |
|---------------|------------|-----|-----|-----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 0 | T1 | T2 | T3 | T4 |
| 1 | T5 | T6 | T7 | T8 |
| 3 | T9 | T10 | T11 | T12 |

7. Resultados e Discussão

Obtenção de plântulas matrizes:

O estabelecimento de plantas *in vitro* depende do sucesso da metodologia aplicada na assepsia dos explantes. Neste sentido, a imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 10 minutos alcançou 98% de eficiência no controle do crescimento de microrganismos sem prejuízo para a viabilidade das sementes. Desta forma obtiveram-se plântulas matrizes para fonte dos explantes, os quais foram segmentos nodais e folhas inteiras.

As condições experimentais aplicadas aos explantes foliares e de segmentos nodais de *Solanum sessiliflorum* (cubiu), em meio de MS completo e 1/4 de força dos macronutrientes, acrescidos de vários níveis dos reguladores de crescimento ácido indolil butírico (AIB) e benzil amino purina (BAP), resultaram em respostas diferenciadas de calogênese in vitro, avaliada pela massa fresca de calos (MFC), conforme constatado na análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Assim foi possível confirmar efeitos do tipo de explante quando em meio de MS 1/4, em relação aos reguladores de crescimento. Desta forma, em segmentos nodais, os tratamentos em que o BAP ou o AIB estão isolados, e nas maiores concentrações testadas (3mg/L), resultaram em maiores MFC que quando combinados (Quadro 2).

Quadro 2. Análise das médias em níveis de AIB e BAP para massa fresca de calo em meio MS 1/4 da força em segmento nodal de *Solanum sessiliflorum*.

| Tratamentos | | AIB | | | | Médias de BAP |
|---------------|---|---------|--------|--------|---------|---------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| BAP | 0 | 0,49bA | 0,47aA | 0,54aA | 0,71abA | 0,55a |
| | 1 | 0,63bAB | 0,53aB | 0,59aB | 0,89aA | 0,67a |
| | 3 | 0,99aA | 0,55aB | 0,48aB | 0,48bB | 0,61a |
| Médias de AIB | | 0,67A | 0,52B | 0,53AB | 0,68A | 0,60 |

- Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ainda no meio MS 1/4, em explantes foliares os reguladores apresentaram os melhores efeitos sobre a MFC, quando isoladamente. Assim maiores MFC em folhas foram observadas em concentrações a partir de 1mg/L de BAP e em 2mg/L de AIB (Quadro 3).

Quadro 3. Análise das médias em níveis de AIB e BAP para massa fresca de calo em meio MS 1/4 da força em folhas de *Solanum sessiliflorum*.

| Tratamentos | | AIB | | | | Médias de BAP |
|---------------|---|--------|--------|---------|--------|---------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| BAP | 0 | 0,49bB | 0,93aB | 2,04aA | 0,64aB | 1,02ab |
| | 1 | 1,55aA | 1,58aA | 1,03bAB | 0,74aB | 1,24a |
| | 3 | 1,34aA | 0,67bA | 0,88bA | 0,61aA | 0,88b |
| Médias de AIB | | 1,15A | 1,09AB | 1,31A | 0,66B | 1,06 |

- Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Explantes foliares em meio de MS completo apresentaram maior MFC na ausência de reguladores no meio (tratamento controle) e na combinação de 3mg/L de BAP com 2mg/L de AIB



(Quadro 4). Situação diferente foi observada por Feitosa et al., (2013) que relatam pouca formação de calo em explantes foliares de *Jatropha curcas*, na ausência de AIB ou BAP, sendo os calos maiores na interação destes reguladores.

As resposta ora observadas em cubiu permitem economizar no uso futuro de reguladores de crescimento, e otimizar a calogênese *in vitro* de explantes provenientes de folhas e segmentos nodais.

Quadro 4. Análise das médias em níveis de AIB e BAP para massa fresca de calo em meio MS completo em folhas de *Solanum sessiliflorum*.

| Tratamentos | | AIB | | | | Médias de BAP |
|---------------|---|--------|--------|--------|---------|---------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| BAP | 0 | 1,92aA | 0,33aB | 0,17bB | 0,12bB | 0,36b |
| | 1 | 0,17bA | 0,27aA | 0,24bA | 0,60abA | 0,32b |
| | 3 | 0,41bB | 0,36aB | 1,85aA | 1,15aAB | 1,00a |
| Médias de AIB | | 0,44A | 0,32A | 0,79A | 0,70A | 0,59 |

- Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Embora a calogênese tenha ocorrido de forma frequente, a organogênese ocorreu apenas de forma indireta. Os calos de explantes foliares apresentaram maior capacidade de organogênese no meio de MS completo, em que foi possível observar a formação de raízes e brotos, que variou de 11 a 66% das repetições nos vários tratamentos. Estes explantes em meio de MS 1/4 produziram apenas raízes. Nos calos de segmentos nodais no meio de MS 1/4 observou-se a formação de raízes e brotos em 11 a 83% das repetições nos tratamentos. Desta forma conclui-se que os tratamentos foram eficientes para induzir calogênese, mas é necessária nova investigação para alcançar a organogênese direta *in vitro* em cubiu.

8. Referências

SILVA FILHO, D. F.; MACHADO, F. M. 1997. Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). In: Cardoso, M. O. (ed). Hortaliças não convencionais da Amazônia. Brasil.

AUGUSTO, E. 2002. Maná-cubiu: a fruta dos deuses. Guia Rural & Negócios, novembro 2002. Disponível em: <http://bioflorestal.com.br/brasil/?events=revista-guia-rural-negocios-mana-cubiu-a-fruta-dos-deuses> Acesso em: 15 de abril de 2015. BORGES, E.E.L. & RENA, A.B. 1993.



Germinação de sementes. In Sementes florestais tropicais (I.B. Aguiar, F.C.M. Piña-Rodrigues & M.B. Figliolia, coords.). Abrates, Brasília, p.83-135.

BARBOSA PIRES, ALINE MARA; SANTIAGO SILVA, PAULA; MOREIRA NARDELLI, PAULA; GOMES, JOSÉ CARLOS; MOTA RAMOS, AFONSO. 2006. Caracterização e processamento de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). Revista Ceres, vol. 53, n. 307, p. 309-316. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

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

SRISKANDARAJAH, S., MULLINS, M. G., NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**, Limerick, v.24, p.1-9, 1982.

FEITOSA, L. S.; COSTA, A. S. da; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; DIBAX, R.; BOTÂNICO, M. P.; BLANK, A. F. (2013). INDUÇÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). Bioscience Journal, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 370-377.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; VASCONCELOS, N.J.S.; indução de calos e aspectos morfogênicos de *Puffia tuberosa* (Spreng) Hicken, Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, V.8, n.3, p.89-95, 2006. GEORGE, E. F. (Ed.). Plant propagation by tissue culture: the technology. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. pt. 1, 574 p.

KIELSE, P.V.N.; FRANCO, E.T.H.; FRASSETTO, E.G Indução de calogênese em explantes de *Paraptademia rígida*. Revista Brasileira de Biociências, v.5, supl.2, p.84-86, 2007.

RAMAGE, C.; WILLIAMS, R.R. 2002. Mineral nutritional and plant morphogenesis. In vitro cell. Dev. Biol. Plant, n. 38, p. 116 – 124.

SKOOG, F., MILLER, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118–131.

