

EFEITO DO 2,4-D E DA SACAROSE NA REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE COTILÉDONES DE *SOLANUM SESSILIFLORUM* DUNAL

Joselaine Viganó¹
Josenéia Aparecida Viganó²
Cristiana Leonardi da Luz³
Cristiane Luz³
Suzana Stefanello¹
Jeison Paulo Viganó⁴

RESUMO

Pelo alto potencial econômico atribuído ao cubiu e por seu cultivo apresentar limitações, estudos com esta Solanácea vêm sendo intensificados. Neste sentido, a micropropagação surge como uma alternativa viável, por permitir a obtenção de um elevado número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo. Assim, objetivou-se avaliar o efeito do 2,4-D e da sacarose na regeneração *in vitro* a partir de cotilédones de *Solanum sessiliflorum* Dunal, buscando estabelecer um protocolo via embriogênese somática. Utilizou-se como explantes, cotilédones inteiros obtidos das plântulas germinadas *in vitro*, os quais foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura MS suplementado com 2, 4, 6 e 8 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 3, 6 e 9% de sacarose. As culturas foram mantidas no escuro, a 24°C±2°C por um período de 45 dias, sendo avaliadas a cada 15 dias. Houve intensa proliferação de raízes em meios isentos de 2,4-D e de calos à medida que as concentrações de 2,4-D aumentaram. As combinações empregadas não estimularam a indução da rota embriogenética para a espécie.

Palavras-chaves: Calos. Cubiu. Explantes. Micropropagação.

ABSTRACT

For the high economical potential attributed to the cubiu and for your cultivation to present limitations, studies with this Solanaceae have been intensified. In this sense, the micropropagation appears as a viable alternative, for allowing the obtaining of a high number of healthy plants and genetically uniform and in short space of time. Like this, it was aimed at to evaluate the effect of the 2,4-D and of the sucrose in the regeneration *in vitro* starting from cotyledons of *Solanum sessiliflorum* Dunal, looking for to establish a protocol through somatic embryogenesis. It was used explants cotyledons whole obtained of the seedlings germinated *in vitro*, which they were inoculated in plates of Petri with middle of culture MS suplementado with 2, 4, 6 and 8 mg L⁻¹ of 2,4-D combined with 3, 6 and 9% of sucrose. The cultures were maintained in the darkness, to 24°C±2°C for a period of 45 days, being appraised every 15 days. There was intense proliferation of roots in exempt means of 2,4-D and of cali as the concentrations of 2,4-D increased. The combinations maids didn't stimulate the induction of the embriogenetic way for the species.

Keywords: Cali. Cubiu. Explants. Micropropagation.

¹ Doutora em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá - UEM - Maringá, PR, Brasil. E-mail: jovigano@gmail.com.

² Especialista em Biotecnologia e Análise da Biodiversidade - Universidade Paranaense - UNIPAR - Campus Toledo. E-mail: joseneiavigano@hotmail.com.

³ Bióloga, Universidade Paranaense - UNIPAR - Campus Toledo. E-mail: crisleonardi@yahoo.com.br; cleonardi2002@yahoo.com.br.

⁴ Especialista em Fertilidade de Solo e Nutrição de Plantas. Faculdade Assis Gurgacz - FAG - Cascavel, PR. E-mail: jpvigano@hotmail.com.

1 INTRODUÇÃO

O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é uma Solanácea que vem sendo cultivada em diversos tipos de solos da Amazônia Ocidental e que foi domesticada pelos índios (SCHULTES, 1984 apud SILVA FILHO; CLEMENT; NODA, 1989). A planta também vem sendo cultivada na Estação Experimental Santa Luzia, em condições de clima da região sudeste do Brasil, a qual também é pioneira na produção em escala comercial de frutos, sementes e matrizes, tendo já selecionadas três variedades de cubiu, com excelente potencial genético para utilização nas condições edafoclimáticas da região sul do Brasil. Dentre as variedades selecionadas, estão a Santa Luzia (fruto redondo), a Thaís (fruto comprido arredondado nas pontas) e a Mosquet (redondo estrelado). No entanto, as duas primeiras demonstraram serem mais produtivas que a terceira, podendo chegar a produzir de 40 a 80 toneladas por hectare, sendo que seus frutos podem chegar a 300 gramas por unidade (ESTAÇÃO EXPERIMENTAL SANTA LUZIA, 2006).


Além das regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil, existem indícios de que agricultores estejam produzindo estas variedades no sul do Brasil. A Estação Experimental de Pesquisa da EPAGRI, localizada em Urussanga (SC), vem cultivando este fruto desde 2002, com resultados promissores de adaptação (BRANCHER, 2003). O cubiu vem sendo cultivado também em municípios do Paraná, entre eles Cianorte, Santa Helena e Enéias Marques. A partir destas considerações, é possível afirmar que a planta vem demonstrando ser uma nova e rentável alternativa para os produtores rurais brasileiros.

O fruto do cubiu pode ser consumido in natura (OLIVEIRA, 2006) ou utilizado como fonte de matéria-prima para a produção de sucos, doces e compotas (SILVA FILHO, 2002). Na medicina, é indicado no tratamento da anemia, do controle do colesterol, ácido úrico e diabetes. Quanto ao seu valor nutricional, é rico em ferro, niacina (uma vitamina do complexo B), ácido cítrico e pectina (SILVA FILHO, 1994). O suco é utilizado empiricamente para eliminar coceiras na epiderme e contra piolhos e, ainda, na preparação de cosméticos mais elaborados com propriedades de limpeza, brilho e hidratação capilar (SILVA FILHO et al., 1997) e no combate a caspa e seborreia (ESTAÇÃO EXPERIMENTAL SANTA LUZIA, 2006).

Com a evidência do potencial econômico, estudos com o cubiu vêm sendo intensificados, porém a cultura apresenta algumas limitações. Identificou-se que as sementes perdem rapidamente o vigor germinativo, a germinação é desuniforme e as mudas levam de 40 a 90 dias para estarem prontas para o transplante, o que torna a produção muito demorada e com necessidade de manejo intensivo. Nesse contexto, a produção de mudas por meio da cultura de tecidos pode ser uma alternativa viável, por permitir a produção em larga escala de mudas geneticamente uniformes e livres de agentes fitopatogênicos (FERREIRA et al., 1998).

Dentre as ferramentas biotecnológicas existentes, a cultura de tecidos é uma das técnicas que tem propiciado maiores resultados práticos e de impacto para o melhoramento vegetal (FREITAS; BERED, 2003), a qual tem sido empregada tanto na propagação massal, quanto em programas de melhoramento genético (CARVALHO, 1999), com o objetivo de reduzir o tempo de lançamento de cultivares geneticamente superiores (FERREIRA et al., 1998).

A técnica por meio da micropropagação, propagação vegetativa in vitro ou, ainda conhecida como clonagem in vitro, é utilizada especialmente naquelas plantas que possuem dificuldade de propagação pelos métodos convencionais, possibilitando a obtenção de elevado número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes, reduzindo o período de tempo para sua obtenção (CARVALHO, 1999).



A cultura *in vitro* é um processo através do qual, pequenos fragmentos de tecido vivo, denominados explantes, são cultivados em condições assépticas em meio de cultura, colocados em recipientes apropriados e mantidos em ambientes com luminosidade e temperatura controladas (MODA-CIRINO; RIEDE, 1999). Tal metodologia baseia-se no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na sua potencialidade para produzirem órgãos, como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) num meio de cultivo em condições adequadas (CARVALHO, 1999; CID, 2001).

Segundo Cid (2001), apesar de toda a diversidade de procedimentos, a cultura de tecidos possui características básicas: a assepsia, o explante, o meio nutritivo e os fatores ambientais como luz, temperatura, CO₂ e O₂. Conforme Carvalho (1999), o meio nutritivo deve ser composto por diferentes sais, uma fonte de carbono como a sacarose, além de vitaminas e “reguladores de crescimento”, sendo os mais importantes para a micropropagação, as auxinas, citocininas e giberelinas. De acordo com Cid (2001), estas substâncias têm ação similar aos hormônios vegetais, no entanto, são sintéticas, sendo responsáveis pelo direcionamento do processo morfogênético. A formação da raiz, brotação aérea e calo em cultura de tecidos são regulados pela disponibilidade e interação entre auxinas e citocininas.

As auxinas são comumente usadas para induzir o desenvolvimento de nós, para a formação de calo e desenvolvimento de raízes adventícias (CARVALHO, 1999). Compostos sintéticos semelhantes às auxinas têm sido testados em vários experimentos, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), usado na indução de embriogênese em diversas linhagens de milho. O 2,4-D tem estimulado a formação de calo, mesmo em baixas concentrações (BORGATTO; HAYASHI, 2002). Já as citocininas são responsáveis pela divisão celular, e em concentrações elevadas promovem a indução de brotos aéreos e inibem a formação de raízes. As giberelinas induzem o desenvolvimento de nós e o crescimento dos meristemas, ou gemas *in vitro*; também podem romper a dormência de embriões isolados ou gemas e inibir a formação de raízes e brotos adventícios (CARVALHO, 1999).

Neste sentido, a cultura de tecidos é uma ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada para o cultivo do cubiu, uma espécie promissora, com potencialidades para a agroindústria. Foram relatados cultivos relacionados à organogênese da espécie (HENDRIX; LITZ; KIRCHOFF, 1987; CORDEIRO; MATTOS, 1991; BOUFLEUHER et al., 2008; Shuelter et al., 2009). No entanto, escassos são os trabalhos sobre o tema e que estão disponíveis sobre a cultura, a exemplo de Stefanello et al. (2018), o que justificou a realização da presente pesquisa. Assim, a realização de estudos buscando o estabelecimento de um protocolo regenerativo via embriogênese somática, testando diferentes explantes, meios de cultura e reguladores de crescimento são de muita importância.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do 2,4-D e da sacarose na regeneração *in vitro* a partir de cotilédones de *Solanum sessiliflorum* Dunal, buscando estabelecer um protocolo via embriogênese somática.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Paranaense (UNIPAR) – Campus Toledo, em Toledo estado do Paraná, durante os meses de janeiro a março de 2006.

2.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Inicialmente, realizou-se a semeadura in vitro, utilizando sementes da variedade Santa Luzia, as quais encontravam-se armazenadas em geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) há aproximadamente quatro meses. A esterilização das sementes foi realizada por meio da imersão em etanol 70% por um minuto, seguida pela imersão em solução de água sanitária a 40% por 20 minutos e três lavagens em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, realizou-se a inoculação em frascos tipo maionese contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas de MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de ágar e tendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

As culturas permaneceram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação luminosa fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (20 W, Osram, Brazil). A temperatura foi mantida a $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Decorridos 15 dias da instalação do experimento, as plântulas cultivadas in vitro foram usadas como fonte de explantes para a instalação do experimento de indução.

2.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO 2,4-D E DA SACAROSE A PARTIR DE COTILÉDONES

Cotilédones inteiros foram obtidos assepticamente das plântulas germinadas in vitro. Estes explantes foram inoculados em placas de Petri com 25 mL de meio de cultura basal MS suplementado com vitaminas do MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6,5% de ágar, cinco concentrações (T1: 0; T2: 2; T3: 4; T4: 6 e T5: 8 mg L⁻¹) de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 3 concentrações de sacarose (3, 6 e 9%). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento no escuro a temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 45 dias após a inoculação. A cada 15 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis: formação de calos, raízes, brotações e surgimento de embriões somáticos.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema de fatorial duplo totalizando 15 tratamentos: cinco concentrações de 2,4-D e três de sacarose. A unidade experimental consistiu de uma placa de Petri com 10 explantes e 4 repetições.

As variáveis obtidas foram sempre agrupadas pela unidade experimental inicial, ou seja, os explantes obtidos foram sempre agrupados pela sua repetição.

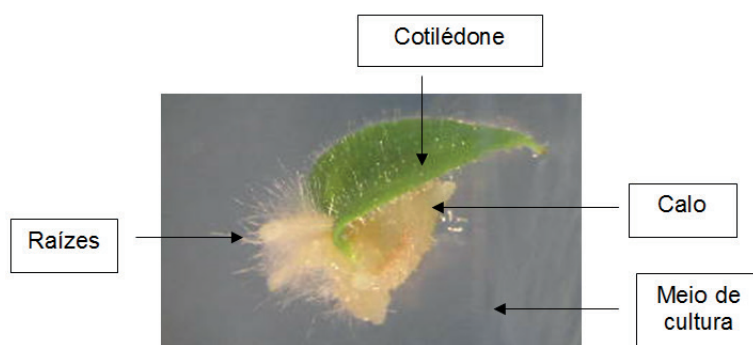
Os pré-requisitos para a realização da análise de variância foram testados, e não foi observada a distribuição normal dos dados e a homocedasticidade das variâncias, pelo fato dos dados serem muito discrepantes, com valores entre zero e 100%. Optou-se pela não transformação dos dados originais, utilizando-se, portanto, da análise descritiva dos dados, ilustrando as variáveis por meio de porcentagens e estas apresentadas na forma de gráficos no Excel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os resultados referentes à formação de raízes e indução de calos em função das concentrações de 2,4-D e sacarose, durante os 45 dias de cultivo *in vitro*, encontram-se nas Figuras. A formação de raízes e de calos sobre explante cotiledonar inoculado em meio de cultura MS, suplementado com 2,4-D, pode ser visualizada na Figura 1.

Figura 1 - Formação de raízes e calos sobre explante cotiledonar inoculado em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D.



Fonte: Elaborado pela autora.

Percebe-se que os calos formados neste período apresentaram-se esbranquiçados e friáveis (Figura 1) e formados a partir da região basal dos explantes cotiledonares.

Na avaliação realizada aos 15 dias após inoculação dos explantes cotiledonares, verificou-se que na ausência do regulador de crescimento (2,4-D), as melhores combinações foram com 3 e 6% de sacarose para formação de raízes (100%). Houve formação de calos, porém, em porcentagem baixa de 32,9% utilizando-se 9% de sacarose (Figuras 2 e 3).

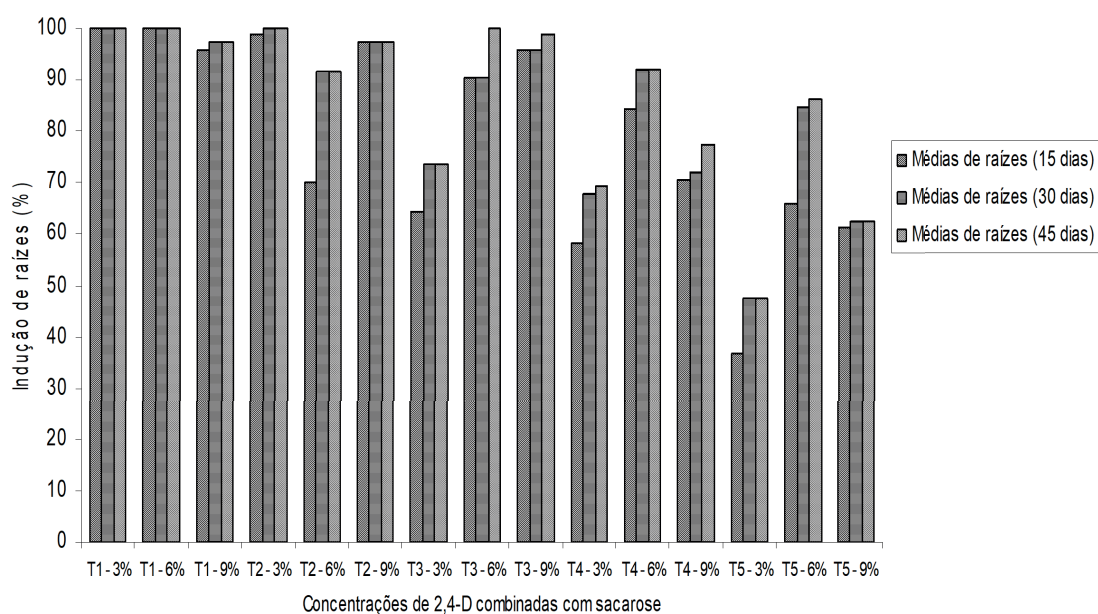
Quando o meio de cultura foi suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, a maior porcentagem de proliferação de raízes ocorreu combinada com 3% de sacarose (98,72%). Para a indução de calos, verificou-se formação de 100% nas concentrações de 3 e 6%, assim como verificado anteriormente, na ausência da auxina (Figuras 2 e 3).

Para a combinação empregada no tratamento 3 referente a adição de 4 mg L⁻¹ da auxina, os melhores resultados foram obtidos com 9% de sacarose para a obtenção de raízes (95,92%). Já para calos, a 6 e 9%, quando os explantes apresentaram 100% de formação (Figuras 2 e 3).

Com relação ao tratamento 4, utilizando-se de 6 mg L⁻¹ de 2,4-D, as maiores porcentagens de raízes foram observadas com 6% de sacarose (84,24%). Na concentração 9% de sacarose, formaram-se 91,39% de calos (Figuras 2 e 3).

Na concentração de 8 mg L⁻¹ de 2,4-D, combinando-se 6% de sacarose verificou-se a máxima formação tanto de raízes (65,9%), quanto de calos (98,72%) (Figuras 2 e 3). Pôde-se verificar também que, conforme aumentou a concentração de 2,4-D no meio de cultura, houve em média um decréscimo na indução de raízes (Figura 2). As Figuras 2 e 3 demonstram as porcentagens médias de indução de raízes e calos durante os 45 dias de cultivo *in vitro* dos explantes cotiledonares.

Figura 2 – Percentagens médias de indução de raízes em resposta as concentrações de 2,4-D e sacarose durante os 45 dias de cultivo *in vitro*. T1: 0; T2: 2; T3: 4; T4: 6 e T5: 8 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 3 concentrações de sacarose (3, 6 e 9%).



Na Figura 3, podem ser visualizadas as porcentagens médias de indução de calos aos 15 dias. Contudo, nesse período de indução, não foi visualizada a formação de brotações aéreas e embriões.

Na avaliação realizada aos 30 dias de cultivo *in vitro*, pôde-se verificar que os meios de cultura isentos de 2,4-D e suplementados com sacarose (3 e 6% de sacarose) permitiram maior formação de raízes (100%), concordando com a avaliação anterior; quanto à indução de calos, obteve-se uma porcentagem de 67,67% com 9% de sacarose, assim como aos 15 dias, porém, considerada superior (Figuras 2 e 3).

Com relação ao tratamento 2 (2 mg L⁻¹ de 2,4-D), os melhores resultados quanto à formação de raízes foram obtidos combinando-se a auxina com 3% de sacarose; para calos, 3 e 6% foram as concentrações ideais para tal indução. Para as duas situações, observa-se que 100% dos explantes apresentaram respostas morfogênicas (Figuras 2 e 3). Os dados obtidos nesta avaliação podem ser correlacionados aos do período anterior, no entanto, houve um pequeno acréscimo na formação de raízes, passando de 98,72% para 100%.

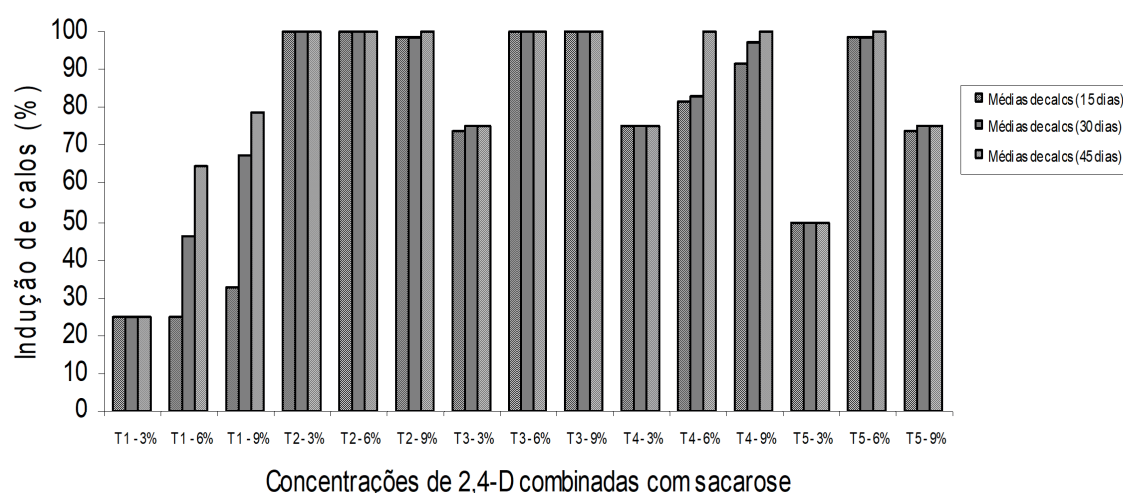


Ao analisar-se as respostas dos explantes nos meios de cultura acrescidos com 4 mg L⁻¹ de 2,4-D, verificou-se que houve 95,92% de indução de raízes na combinação com 9% de sacarose, percentagem que se manteve estável quando comparada à avaliação aos 15 dias; quanto aos calos, obteve-se 100% de indução nas concentrações 6 e 9%, assim como verificado no período anterior (Figuras 2 e 3).


No que se refere ao tratamento 4, correspondente à concentração 6 mg L⁻¹ de 2,4-D, nota-se que ocorreu formação de raízes de maneira acentuada na combinação com 6% de sacarose, atingindo aproximadamente 92,07% de indução, em relação as combinações com 3% e 9%.

Quanto à formação de calos, 97,42% dos explantes foram induzidos a calogênese, na combinação com 9% de sacarose (Figuras 2 e 3). Partindo destas percentagens verificou-se aumento na indução para ambas as respostas morfogênicas, comparando-se ao período de 15 dias de cultivo.

Figura 3 – Percentagens médias de indução de calos em função do 2,4-D mg L⁻¹ e da sacarose durante os 45 dias de cultivo *in vitro*. T1: 0; T2: 2; T3: 4; T4: 6 e T5: 8 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 3 concentrações de sacarose (3, 6 e 9%).



Empregando-se 8 mg L⁻¹ da auxina pôde-se observar que ocorreu maior percentagem de formação de raízes (84,8%) e calos (98,72%) na combinação com 6% de sacarose (Figuras 2 e 3). Quanto aos dados obtidos na primeira avaliação, pôde-se verificar que a indução de raízes aumentou, no entanto, para calos, houve uma estabilidade, no período considerado. Neste mesmo período de observação (30 dias), verificou-se que sobre os explantes formaram-se brotações aéreas, porém em pequena quantidade, nos tratamentos e nas respectivas concentrações: 2 (0 mg L⁻¹ 2,4-D e 3% de sacarose), 3 (0 mg L⁻¹ e 9% de sacarose), 4 (2 mg L⁻¹ e 3% de sacarose), 6 (2 mg L⁻¹ e 9% de sacarose), 8 (4 mg L⁻¹ e 6% de sacarose), 10 (6 mg L⁻¹ e 3% de sacarose), 11 (6 mg L⁻¹ e 6% de sacarose), 15 (8 mg L⁻¹ e 9% de sacarose). Os calos formados apresentaram-se com características similares as observadas aos 15 dias de indução, ou seja, esbranquiçados e friáveis. Quanto à formação de embriões somáticos não foi evidenciada sobre o material cultivado *in vitro*.



Aos 45 dias de cultivo, verificou-se formação de 100% de raízes nas combinações 3 e 6% de sacarose, assim como mencionado nas avaliações realizadas aos 15 e 30 dias de cultivo. No entanto, ocorreu um acréscimo na indução de calos (78,65%) quando combinou-se a auxina com 9% de sacarose (Figuras 2 e 3).

Para o segundo tratamento testado (2 mg L⁻¹ de 2,4-D), da mesma forma que as avaliações anteriores, a melhor combinação foi a 3%, e a formação de raízes manteve-se em 100%; quanto aos calos, observou-se a estabilidade de indução em 100% para 3 e 6%, mas foi observada ainda a combinação 9% como também apresentando altas percentagens de indução (Figuras 2 e 3).

Quanto à formação de raízes e calos observados no tratamento 3, na concentração 4 mg L⁻¹ de 2,4-D, com 6% de sacarose obteve-se 100% de rizogênese, aos 45 dias. Quanto à indução de calogênese, os explantes mantiveram o comportamento anterior, com 100% de formação (Figuras 2 e 3).

Na avaliação das concentrações empregadas de 6 mg L⁻¹ de 2,4-D verificou-se, que a formação de raízes manteve-se em 92,07%, com 6% de sacarose, aos 30 e 45 dias. Ocorreu um aumento na indução de calos para 100% e incluiu-se como ideal também a concentração de sacarose 6% (Figuras 2 e 3).


Para a análise da concentração mais elevada de 2,4-D (8 mg L⁻¹), verificou-se que, a combinação mais adequada para respostas morfogênicas tanto para raízes quanto para calos, foi a 6%. Para ambas, ocorreu um aumento na indução de 84,8 para 86,15% (raízes) e 98,72 para 100% (calos) (Figuras 2 e 3).

Os calos formados apresentaram as mesmas características observadas aos 15 e 30 dias de indução, ou seja, sendo estes esbranquiçados e friáveis (Figura 1). Ferreira et al. (2001) cultivando explantes de cupuaçuzeiro mantidos em condições de escuro, verificaram após 45 dias, o aparecimento de massa de calos sobre eixos embrionários e cotilédones. Os calos cultivados em meio MS/2 suplementado com 1 e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D apresentavam aspecto branco e brilhante, enquanto nas concentrações de 4 e 8 mg L⁻¹ se observou a formação de massa calosa branco-opaca, diferença de coloração que não foi observada nos calos originados a partir de cotilédones de cubiu. Os calos de cupuaçuzeiro tornaram-se escuros dentro de 56 dias, independente da concentração de 2,4-D, o que também pode ser verificado com o cubiu.

Após 45 dias de cultivo in vitro, uma pequena percentagem de cotilédones de cubiu produziu brotações aéreas (dados não mostrados) sobre os calos originados dos cotilédones. Estas estruturas foram evidenciadas em todos os tratamentos exceto no suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e 9% de sacarose.

Com relação à formação de embriões somáticos sobre o material cultivado in vitro, em nenhum dos tratamentos testados, foram evidenciadas tais estruturas. Os calos começaram a escurecer e a permanência dos mesmos em meio de cultura por mais 60 dias em condições de escuro não estimulou a indução da rota embriogênica para a espécie.

Apesar do 2,4-D ser o regulador de crescimento mais indicado para induzir a embriogênese somática em muitas espécies, o mesmo não foi eficiente para o cubiu nas concentrações e explante testado. De acordo com Freitas; Bered (2003), a embriogênese somática pode ser induzida artificialmente sob condições controladas. Por meio de estímulos químicos, pode-se obter a reprogramação de células somáticas diferenciadas, tornando-as competentes para seguir uma via embriogênica. Em geral, culturas envolvendo o uso de auxinas artificiais, como o 2,4-D, sozinhas ou combinadas a citocininas, possibilitam




a formação de embriões somáticos a partir de praticamente qualquer porção de uma planta. Isso já foi alcançado em mais de 300 espécies. Estes embriões podem ser obtidos *in vitro* provenientes de duas vias morfogênicas: direta, na qual os embriões se originam diretamente na superfície do explante empregado; ou indireta, quando, inicialmente, ocorre a formação de um calo em cuja superfície se formam os embriões. Conforme Grattapaglia; Machado (1998), a maioria dos sistemas de embriogênese somática ocorre pela via indireta, onde calos embriogênicos são induzidos e mantidos ao longo da multiplicação.

Em um trabalho desenvolvido por Almeida; Oliveira; Dantas (2000), com intuito de estabelecer um protocolo de embriogênese somática para o mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Baixinho, a combinação do explante hipocótilo com folhas cotiledonares e meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L⁻¹ de 2,4-D, sob condições de escuro, foi a mais favorável para a indução de calos friáveis. Em geral, os calos friáveis obtidos apresentavam coloração amarelo-pálida e se formavam a partir do ponto de inserção das folhas cotiledonares com o hipocótilo. A formação de calos iniciou-se de três a cinco dias, após a introdução do explante no meio de cultura, e o máximo foi atingido aos 20 dias. Para o cubiu, de modo semelhante, foi visualizada a formação de calos a partir da região basal dos cotilédones.

Em outro trabalho desenvolvido por Ferreira et al. (2004) objetivando propiciar a indução de calos embriogênicos em cupuaçuzeiro, em função do tipo de explante e meio de cultura, foram testados segmentos cotiledonares (1,0 a 1,5 cm) e eixos embrionários divididos em três porções: região da plúmula, radícula e hipocótilo. Os explantes foram cultivados no escuro, em 2 meios de cultura: 1) MS suplementado com 2,4-D (1 mg L⁻¹) e cinetina (0,25 mg L⁻¹); MS acrescido de ácido naftaleno acético (5 mg L⁻¹) e cinetina (0,25 mg L⁻¹). O experimento foi conduzido por 42 dias, sendo realizados subcultivos, ao final dos quais foram observadas as respostas dos explantes as combinações de auxina nos meios testados. Verificou-se na avaliação realizada aos 42 dias, que nenhum calo formou-se quando se empregou como fonte de explante segmentos cotiledonares, independente dos meios testados, resposta justificável pela idade dos explantes já que as sementes foram retiradas de frutos próximos da maturidade. Estes resultados discordam dos obtidos neste trabalho em que porcentagens elevadas de calos foram observadas em meio de cultura, suplementado com 2,4-D e os cotilédones foram retirados de plântulas com 15 dias.

Ferreira et al. (2004) verificaram ainda a indução de calo na região do hipocótilo de eixo embrionário, calos formados mais precocemente do que na região apical e da radícula. O meio MS acrescido de 2,4-D propiciou a formação de calos grandes sobre estes explantes, com aspecto branco e friável. No entanto, após três subcultivos, cessaram o desenvolvimento e escureceram, não levando a indução da rota embriogênica e apresentando respostas semelhantes às observadas neste trabalho, porém, com o emprego de explantes provenientes do eixo embrionário.

A emissão de raízes juntamente com a formação de massa de calos de coloração branca foi obtida em meio de cultura suplementado com ANA e cinetina, a partir da região apical radicular do eixo embrionário. Stefanello et al. (2018) observaram, após 30 dias de cultivo, que todos os explantes cotiledonares e de hipocótilo formaram calos na presença ANA independentemente da suplementação ou não do meio de cultura com KIN. Flores et al. (1998) também verificaram a formação de calos sobre explantes de morango, cultivados em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D, porém utilizando como explantes discos foliares (0,6 cm de diâmetro). Foram testadas seis concentrações (0; 0,66; 1,32; 1,98; 2,65 e 3,31 mg L⁻¹) de 2,4-D ou de picloram na indução da calogênese. Após a inoculação, os explantes foram incubados no escuro por um período de 21 dias. Posteriormente, foram conduzidos à



sala de crescimento em que foram submetidos aos diferentes períodos de escuro (0; 7; 14; 21 e 28 dias) e em meio de cultura básico adicionado de 3,31 mg L⁻¹ de 2,4-D. Os autores observaram a formação de calos em todos os tratamentos, exceto naqueles isentos das auxinas 2,4-D ou picloram. Uma maior intensidade de calo foi obtida com 2,3 mg L⁻¹ de 2,4-D ou de picloram, decrescendo em concentrações superiores e o escuro favoreceu o desenvolvimento dos calos. Resultados semelhantes foram obtidos para o cubiu, onde após 45 dias de cultivo in vitro, observou-se que a suplementação do meio de cultura com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D combinada com 3 e 6% de sacarose, induziu intensa formação de calos, no entanto, nas concentrações de 4 (6 e 9%) e 8 mg L⁻¹ (6%) também pôde-se observar elevada indução (Figura 3). Figueira et al. (2008) trabalhando com cafeeiro, obtiveram bons resultados quanto à eficiência na indução de calos utilizando 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, e explantes a partir de anteras inoculadas em meio MS acrescido de 2,4-D, com presença ou não de nitrato de prata (5,0 mg.L⁻¹) e ácido acetilsalicílico (0,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 mg.L⁻¹). O 2,4-D é eficiente na indução de calos, apesar disso, o nitrato de prata e o ácido acetilsalicílico, nas concentrações utilizadas, não foram eficientes na regeneração dos pró-embrioides nas anteras das cultivares estudadas; Catuaí Vermelho é a cultivar mais responsiva à androgênese quando comparado ao Mundo Novo.

A concentração de sacarose, ou outra fonte de açúcar, tem efeito sobre a multiplicação e o crescimento, sendo que as concentrações de 2 a 4% são as mais empregadas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A sacarose, de acordo com Freitas; Bered (2003) e Caldas; Haridasan; Ferrura(1998) é o carboidrato mais empregado nos meios nutritivos, condicionando as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. A concentração ideal é um fator importante para a obtenção de crescimento ótimo, e isso depende do explante considerado e, ainda, do processo de desenvolvimento desejado: organogênese, calogênese, embriogênese (FREITAS; BERED, 2003).

De acordo com Hu; Ferreira (1998), os carboidratos desempenham um importante papel na manutenção da osmolaridade adequada do meio de cultura. Em alguns estudos realizados com diferentes concentrações de sacarose, atribuiu-se a este açúcar a propriedade osmorreguladora, ou seja, determinadas quantidades empregadas no meio de cultura estariam retendo a água em excesso, que possivelmente dificultaria o desenvolvimento de calos, os quais ficariam hipertônicos. Porém, altas concentrações foram testadas para o cubiu, pois em cultivos anteriores havia sido observada a formação de calos hiper-hídricos. Foi obtido sucesso no controle da hiper-hidricidade com o aumento das concentrações de sacarose acima de 3%, porém isto não favoreceu a formação de embriões somáticos.

Stefanello et al. (2018), conseguiram obter diretamente sobre os cotilédones de embriões zigóticos imaturos cultivados em meio de cultura MS suplementado com 5 e 10 mg L⁻¹ de 2,4-D foram observadas estruturas semelhantes a embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. No presente trabalho não foram obtidos embriões somáticos, entretanto, os tratamentos foram diferentes concentrações de 2,4-D com sacarose.

4 CONCLUSÃO

Após 45 dias de cultivo *in vitro*, houve intensa proliferação de raízes em meios de cultura isentos de 2,4-D e de calos à medida que as concentrações de 2,4-D aumentaram, porém, as combinações empregadas não levaram a indução da rota embriogenética.

Sugere-se a realização de estudos futuros utilizando outras fontes de explantes como botões florais, embriões zigóticos, outros reguladores ou outras combinações de reguladores, combinando altas concentrações de auxinas e baixas de citocinina, testando o cultivo em condições de luminosidade e no escuro.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.P.; OLIVEIRA, R.P.; DANTAS, J.L.L. Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.10, p.2017-2024, 2000.
- BORGATTO, F.; HAYASHI, T.K. Biotecnologia de plantas. In: CAMARGO-CASTRO, P.R.; SENA, J.O.A.; KLUGE, R.A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: EDUEM, 2002.
- BOUFLEUHER, L.M.; SCHUELTER, A.R.; DA LUZ, C.L.; LUZ, C.L. da; ANTES, V.A.; STEFANELLO, S.; COMERLATO, A.P.; OTONI, W. C. *In vitro* propagation of *Solanum sessiliflorum* Dunal as affected by auxin and cytokinin combinations and concentrations. **Asian Journal of Plant Sciences**, 7:639-646, 2008.
- BRANCHER, A. **Agrônomo planta fruto exótico em Urussanga**. 2003. Disponível em: <www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=3687>. Acesso em: 17 jul. 2006.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1998.
- CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: EMBRAPA, 1999.
- CID, L.P.B. A propagação in vitro de plantas. O que é isso? *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Ano III, n.10, p. 16-21, 2001.
- CORDEIRO, A.R.; MATTOS, N. O. In vitro regeneration of several acessions of *Solanum tojiro* & *Bonpl.* and *Solanum sessiliflorum* Dun. (Cúbio). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 26:1931-1936, 1991.
- ESTAÇÃO EXPERIMENTAL SANTA LUZIA. **Manual de cultivo. Maná: super fruta**. Disponível em: <frutasexoticas.com.br/sementes.htm>. Acesso em: 28 jun. 2019.
- FERREIRA, M.E. et al. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1998.
- FERREIRA, M.G.R.; CÁRDENAS, F.E.N.; CARVALHO, C.H.S.; CARNEIRO, A.A.; DAMIÃO FILHO, C.F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.473-476, 2001.
- FERREIRA, M.G.R.; CÁRDENAS, F.E.N.; CARVALHO, C.H.S.; CARNEIRO, A.A.; DAMIÃO FILHO, C.F. Indução de calos embriogênicos em explantes de cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.372-374, 2004.

FIGUEIRA, E.R.; LONDE, L.N.; MARQUES, R.V.; MARQUES, S.V.; SILVA, A.S.; LUZ, M.Q. Influência do 2,4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico no cultivo in vitro de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.1, p.27-33, 2008.

FLORES, R.; GOMES, P.R.; FARIA, J.T.C.; CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; PETERS, J.A. Calogênese in vitro de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria x Ananassa*) a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v.4, n.1, p.09-14, 1998.

FREITAS, L.B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

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-SPI/CNPH, 1998.

HENDRIX, R.C.; LITZ, R.E.; KIRCHOFF, B.K. In vitro organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum* Lindl., *S. quitoense* Lam. (naranjilla) and *S. sessiliflorum* Dunal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.11, n.7873, p.67-73, 1987.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1998.

MODA-CIRINO, V.; RIEDE, C.R. Aspectos gerais de biotecnologia e cultura de tecidos. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL, 1999.

MURASHIGE, T.E.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays for tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, W. **Cultivo e uso do cubiu (*Solanum sessiliflorum*)**. Manaus: INPA, Disponível em: <www.inpa.gov.br/cpca/areas/cubiu.html>. Acesso em: 18 jul. 2006.

SILVA FILHO, D.F.; CLEMENT, C.R.; NODA, H. Variação fenotípica em frutos de doze introduções de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) avaliadas em Manaus, AM, Brasil, **Acta Amazônica**, Manaus, v.19, p.9-18, 1989.

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**. 1994. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1994.

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**, Manaus, v. 27, n. 4, p. 229-240, 1997.

SILVA FILHO, D.F. **Discriminação de etnovariiedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal, *Solanaceae*) da Amazônia, com base em suas características morfológicas e químicas**. 2002. 116 f. Tese (Doutorado em Biologia Tropical e Recursos Naturais), INPA/UFAM - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2002.

STEFANELLO, S.; SCAPIM, C.A.; SCHUELTER, A.R.; BARRETO, R.R.; SILVA, J.M. Somatic embryogenesis induction in cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Plant Cell Cult**. Micropropag., Lavras, v. 14, n. 1, p.1-9, 2018.