

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO AGRICULTURA E AMBIENTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

PRISCILA MORAIS RODRIGUES

**USO DA CULTURA *IN VITRO* COMO FERRAMENTA PARA CONSERVAÇÃO DE
GERMOPLASMA E ESTUDOS DE ECOFISIOLOGIA DE *Solanum*
sessiliflorum Dunal**

**HUMAITÁ - AM
JUNHO/2024**

**USO DA CULTURA *IN VITRO* COMO FERRAMENTA PARA CONSERVAÇÃO DE
GERMOPLASMA E ESTUDOS DE ECOFISIOLOGIA DE *Solanum*
sessiliflorum Dunal**

PRISCILA MORAIS RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA), do Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente (IEAA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

ORIENTADOR: PROF. Dr. JOÃO HENRIQUE FROTA CAVALCANTI

COORIENTADORA: Dra. PRISCILA OLIVEIRA SILVA

**HUMAITÁ - AM
JUNHO/2024**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R696c Rodrigues, Priscila Morais
 Usu da Cultura in vitro como ferramenta para conservação de germoplasma e estudos de ecofisiologia de Solanum sessiliflorum Dunal / Priscila Morais Rodrigues . 2024
 51 f.: il. color; 31 cm.

 Orientador: João Henrique Frota Cavalcanti
 Coorientadora: Priscila Oliveira Silva
 Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal do Amazonas.


 1. Cultura de tecidos . 2. Biotecnologia. 3. Organogênese. 4. Solanum sessiliflorum Dunal. I. Cavalcanti, João Henrique Frota. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO


TÍTULO: (Uso da cultura *in vitro* como ferramenta para conservação de germoplasma e estudos de ecofisiologia de *Solanum sessiliflorum* Dunal) (Linha de pesquisa 01: Componentes dinâmicas dos ecossistemas com ênfase no bioma amazônico).

PRISCILA MORAIS RODRIGUES


Dissertação defendida e aprovada em 06 de junho de 2024, pela comissão julgadora:

Documento assinado digitalmente
 JOAO HENRIQUE FROTA CAVALCANTI
Data: 11/07/2024 13:19:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Henrique Frota Cavalcanti Orientador
(Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente – IEAA/UFAM)

Documento assinado digitalmente
 DEYVID DIEGO CARVALHO MARANHÃO
Data: 10/07/2024 18:47:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Deyvid Diego Maranhão Examinador(a) Interno
(Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente – IEAA/UFAM)

Documento assinado digitalmente
 JAQUELINE MARTINS VASCONCELOS
Data: 10/07/2024 12:17:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

aminador(a) externo
(Universidade Federal de Rondônia – UNIR)

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela vida que Ele me concedeu, por tudo que tive, que tenho e que sou. Nos momentos de angústia seu amor e seu conforto se fizeram presentes. És realmente o maior responsável por esta conquista.
- Ao Prof. Dr. João Henrique Frota Cavalcanti pela orientação, confiança e amizade, que me incentivaram a percorrer o caminho da pesquisa e possibilitaram a realização deste.
- A Dra. Priscila Oliveira Silva pela coorientação, incentivo, amizade e por todo conhecimento transmitido com muito profissionalismo.
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – PPGCA por todo conhecimento transmitido e por estarem comprometidos com a qualidade e excelência do ensino.
- Aos técnicos pelo grande trabalho feito para o bom andamento deste curso de pós-graduação.
- À minha família, meu bem mais precioso, meu alicerce, pela compreensão e por ter me dado todo apoio necessário para que eu chegasse até aqui.
- Aos amigos de turma pela oportunidade de convívio, troca de ideias e por compartilharem inúmeros desafios, sempre com espírito colaborativo. Em especial, minhas amigas Giovanna da Silva Barroso e Lucilene dos Santos do Nascimento.
- Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio financeiro durante a realização desta pesquisa.

*”Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.”*

(Martin Luther King)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características morfológicas de *Solanum sessiliflorum* DUNAL: (A) Detalhes da planta de cubiu; (B) Vista externa do fruto; (C) Vista interna do fruto com exposição das sementes. 8

Figura 2: Organogênese de explantes hipocotiledonares de duas etnovarietades de *Solanum sessiliflorum* Dunal 30 dias após a inoculação dos explantes em meios de cultura contendo diferentes concentrações de citocinina e auxina.....24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação do efeito das diferentes concentrações de citocininas e auxinas em segmentos hipocotiledonar.....	22
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS

°C –	Graus Celsius
ANOVA –	Análise de Variância
B5 –	Meio de Cultura de Gamborg (1968)
DIC –	Delineamento Inteiramente Casualizado
INPA –	Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas
LED –	Diodo Emissor de Luz
MS –	Meio de Cultura de Murashige & Skoog (1962)
ODS –	Objetivos do Desenvolvimento Sustentável
ONU –	Organização das Nações Unidas
PANC –	Plantas Alimentícias Não Convencionais
v/v –	volume/volume

RESUMO

RODRIGUES, P. M. Uso da cultura *in vitro* como ferramenta para conservação de germoplasma e estudos de ecofisiologia de *Solanum sessiliflorum* Dunal. 2024. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente, Universidade Federal do Amazonas.

O bioma Amazônia é caracterizado por apresentar a maior biodiversidade do mundo, incluindo espécies promissoras como o cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), uma das plantas alimentícias não convencionais (PANC), nativas da região Amazônica, de alto valor nutricional e social, o que pode gerar oportunidades, agregar renda e trazer melhorias na qualidade de vida familiar. Assim, objetivou-se neste trabalho estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* com o intuito de avaliar a influência de diferentes tipos e concentrações de citocininas e auxina na indução da organogênese a partir de explantes hipocotiledonar de duas etnovarietades de cubiu. Os experimentos serão conduzidos no laboratório de Biologia, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Para a indução da organogênese *in vitro* foram utilizadas sementes maduras de duas etnovarietades de cubiu (1 e 9). As sementes foram desinfestadas e logo após, cerca de três sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 20 mL de meio cultura, com pH 5.8. Os tratamentos foram constituídos por: I) controle (meio MS sem adição de fitohormônios); II) cinetina 1 mg L⁻¹; III) BA 1 mg L⁻¹; IV) BA + cinetina (4,15 mg L⁻¹ + 2,5 mg L⁻¹); V) cinetina + BA + AIA. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para a comparação das médias dos tratamentos, foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância. Os resultados deste trabalho evidenciam que segmentos hipocotiledonares de *Solanum sessiliflorum* Dunal associados à adição de cinetina 1 mg L⁻¹ e BA + cinetina (4,15 mg L⁻¹ + 2,5 mg L⁻¹) são mais eficientes na indução de brotações *in vitro* em cubiu. O meio suplementado com Drew força total proporciona maior formação de calos para a etnovarietade 9. No entanto, visto que a calogênese está positivamente relacionada com a formação de brotos, possivelmente, com um período maior que 30 dias seja possível observar maiores resultados nesse tratamento.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, Biotecnologia, Organogênese, *Solanum sessiliflorum* Dunal,.

ABSTRACT

Rodrigues, P.M. Use of *in vitro* culture as a tool for germplasm conservation and ecophysiology studies of *Solanum sessiliflorum* Dunal. 2024. 51f. Dissertation (Master's in Environmental Sciences) – Institute of Education, Agriculture and Environment, Federal University of Amazonas.

The Amazon biome is characterized by having the greatest biodiversity in the world, including promising species such as cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), one of the non-conventional food plants (PANC), native to the Amazon region, with high nutritional and social value, which can generate opportunities, add income and bring improvements in the quality of family life. Thus, the objective of this work was to establish an *in vitro* propagation protocol with the aim of evaluating the influence of different types and concentrations of cytokinins and auxin on the induction of organogenesis from hypocotyledonary explants of two cubiu ethnovarieties. The experiments will be conducted in the Biology laboratory, at the Federal University of approximately three seeds were inoculated in test tubes containing approximately 20 mL of culture medium, with pH 5.8. The treatments consisted of: I) control (MS medium without addition of phytohormones); II) kinetin 1 mg L⁻¹; III) BA 1 L⁻¹; IV) BA + kinetin (4.15 mg L⁻¹ + 2.5 mg L⁻¹); V) kinetin + BA + AIA. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and, to compare treatment means, the Tukey test was performed at 5% significance. The results of this work show that hypocotyledonary segments of *Solanum sessiliflorum* Dunal associated with the addition of Kinetin 1 mg L⁻¹ and BA + Kinetin (4.15 mg L⁻¹ + 2.5 mg L⁻¹) are more efficient in inducing sprouting *in vitro* in cubiu. The medium supplemented with Drew full strength provides greater callus formation for ethnovariety 9. However, since callogenesis is positively related to the formation of shoots, possibly, with a period of time greater than 30 days it is possible to observe greater results in this treatment.

Keywords: Tissue culture, Biotechnology, Organogenesis, *Solanum sessiliflorum* Dunal.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1.2 Justificativa.....	4
1.3 Objetivos	6
1.3.1 Objetivo Geral.....	6
1.3.2 Objetivo específico	6
1.4 Hipótese.....	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 O Cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	8
2.1.1 Usos do Cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal).....	10
2.1.2 Potencialidade Econômica	11
2.2 Cultura de Tecidos Vegetal.....	11
2.3 Meio de Cultura.....	12
2.4 Aplicações da Cultura de Tecidos	13
2.4.1 Ecológica	13
2.4.2 Agronômica	14
2.4.3 Terapêutica.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Desinfestação e Germinação <i>in vitro</i> das Sementes.....	17
3.2 Indução de Organogênese a partir de Segmentos Hipocotiledonares de <i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	18
3.4 Delineamento e Análise Estatística.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Desinfestação e Germinação <i>in vitro</i> das Sementes	20

4.2	Indução de Organogênese a partir de Segmentos Hipocotilenonares de <i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	21
5	CONCLUSÃO	26
6	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	27
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

O bioma Amazônia é caracterizado por apresentar a maior biodiversidade do mundo, incluindo espécies promissoras como o cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), uma das plantas alimentícias não convencionais (PANC), nativas da região Amazônica, de alto valor nutricional e social, o que pode gerar oportunidades, agregar renda e trazer melhorias na qualidade de vida familiar. (Ribeiro; Durigan; 2018). O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) pertence a família Solanaceae e representa uma entre as várias espécies vegetais tradicionalmente cultivadas na agricultura Amazônica e pouco conhecida pela ciência, mas por apresentar um sistema de produção estabelecido, se tornou uma opção atrativa pelos pesquisadores, para o fortalecimento econômico da agricultura familiar (Cruz et al., 2023).

O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é uma hortaliça-fruto que pode ser cultivada em consórcio com outras espécies, como o maxixe e o feijão de praia, o que impulsiona a conservação ambiental e o desenvolvimento sustentável, além de possibilitar sua inserção nos mais variados sistemas produtivos locais (Silva-Filho et al., 2013). Seu fruto exótico, possui características únicas e sabor agradável, sendo utilizado principalmente na forma de suco, néctares, compotas e doces. Ademais, pode ser utilizado em ensopados, caldeiradas de peixe ou como tempero de pratos à base de carne e frango. (Silva-Filho, 1998; Pires et al., 2006). Interessantemente, apesar do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) apresentar inúmeras vantagens, ainda são poucos conhecimentos disponíveis sobre a propagação desta espécie, sendo normalmente propagada via sementes. (Silva, 2007).

Cultura de tecidos vegetais é uma técnica que merece destaque, pois estudos indicam que a mesma pode auxiliar na obtenção de mudas proveniente de tecidos meristemáticos cultivados *in vitro*, o que é possível, visto que a arquitetura do corpo do vegetal forma-se durante a embriogênese e, principalmente, após o desenvolvimento pós-embrionário a partir de atividades de células com alta atividade de divisão celular referidas como células meristemáticas, localizadas principalmente no ápice caulinar, bem como no ápice da raiz (Taiz et al., 2017). Não obstante, células vegetais possuem a capacidade de retornar ao estágio meristemático para originar novos tecidos e/ou órgãos mesmo após terem sofrido processos ontogenéticos de maturação e especialização celular (Ribeiro et al., 2016). Esse fenômeno é conhecido entre os biólogos vegetais como totipotência celular. Neste contexto, foi

estabelecido a cultura de tecidos vegetal o qual se baseia em um conjunto de técnicas biotecnológicas para propagar novos indivíduos a partir de uma planta matriz, fornecendo ao explante condições favoráveis para o desenvolvimento de uma planta completa e saudável (Souza et al., 2018).

A organogênese é uma via complexa utilizada na cultura de tecidos vegetais que ocorre em um série de etapas através do processo de diferenciação e desdiferenciação celular, e dependendo da retomada da atividade meristemática pode formar células maduras diferenciadas ou tecidos calogênicos desorganizados (Alvez; Xavier; Otoni, 2004). Ademais, a via organogenética é um processo que depende, também, da ação de reguladores de crescimento exógenos e endógenos em particular auxinas e citocininas, e da habilidade do explante em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (Sugiyama, 1999). Portanto, a técnica de cultura de tecidos vegetais, via organogênese, pode ser definida como a manutenção, propagação e regeneração de explantes da planta matriz para formação de clones a partir de cultivos em laboratórios denominado *in vitro*, em um ambiente asséptico e controlado nos parâmetros de luz, nutrientes, reguladores de crescimento e hormônios. (Mroginski et al., 2004).

Inicialmente proposto para pesquisas associadas a estudos de bioquímica e fisiologia vegetal (Mühlbach, 1998), cultura de tecidos tem recebido muita atenção devido a potenciais aplicações biotecnológicas relacionadas desde aspectos ecológicos até produção em larga escala de compostos secundários, os quais podem gerar produtos agregados tanto nas indústrias alimentícias, quanto medicinais (Andrade et al., 2002). Não obstante, o uso biotecnológico da cultura de tecidos foi aplicado para resolver, ou ao menos minimizar, aspectos negativos relacionados a multiplicação sistematizada de plantas, através do processo de micropropagação (Arnaldos et al., 2001). Esse termo genérico refere-se a ao menos três processos de multiplicação clonal *in vitro*: (i) produção de parte aérea a partir de meristema pré-existente; (ii) produção *de novo* de parte aérea seguido de indução de meristema adventício; (iii) embriogênese somática (Bornman, 1993).

O uso de tecnologias de cultura de tecido vegetal no melhoramento genético é enorme. À exemplo, pode-se utilizá-la para estudos de biotecnologia durante introgressão de genes de espécies silvestres para genomas de espécies cultivadas, na produção de plantas engenheiradas e com elevado vigor e potencial agrônomico (Richardson et al., 2013). Além disso, pode ser utilizada na geração de plantas

uniformes para colheitas e para espécies com dormência fisiológica, como guaraná (Schimpl et al., 2019).

Recentemente, *Solanum sessiliflorum* Dunal tem sido alvo de estudos de fisiologia vegetal para gerar conhecimento de como essa planta responde a fatores ambientais. No entanto, devido a certas limitações na germinação e desuniformidade durante a germinação, voltamos nossa atenção, dessa vez, para uso de cultura de tecidos de *Solanum sessiliflorum* Dunal, principalmente por razões aplicadas à agronomia. Do ponto de vista agrônomo, *Solanum sessiliflorum* Dunal possui frutos com grande quantidade de sementes, sendo o processo de semeadura o principal método de propagação e estabelecimento de lavouras comerciais da espécie. Contudo, fatores abióticos como temperatura, umidade e luz são as principais condições associadas à perda da viabilidade das sementes dessa espécie após a colheita dos frutos (Lopes; Pereira, 2005; Stefanello et al., 2008).

Tais fatores, portanto, resultam em perda da viabilidade das sementes mesmo em curtos períodos de armazenamento. Devido a este fato, plantios comerciais tornam-se desuniformes sendo limitado, principalmente a produtores familiares através de agricultura de subsistências realizadas em pequena escala (Pereira et al., 2012; SCHUELTER et al., 2009). Nesse sentido, verifica-se a necessidade de ferramentas tecnológicas que auxiliem na transmissão de informações relacionadas a importância e utilização do fruto, bem como, na busca por resultados cada vez mais promissores quanto ao seu processo germinativo (Yuyama et al., 2008; Stefanello et al., 2008).

Assim, objetivou-se neste trabalho estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* com o intuito de avaliar a influência de diferentes tipos e concentrações de citocininas e auxinas na indução da organogênese a partir de explantes de duas etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal).

1.2 Justificativa

Na Amazônia, as espécies vegetais mais utilizadas pelos agricultores familiares são aquelas decorrentes do processo de domesticação, com ampla variabilidade genética e, no entanto, mais propensas a passarem por processos de aprimoramento genético para fins de aperfeiçoamento (Noda; Noda, 2004). Dentre as muitas espécies de interesse econômico, tecnológico e nutricional presentes na região amazônica, se destaca o cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) uma planta nativa da Amazônia Ocidental, do tipo arbustiva, identificada na Amazônia Brasileira, Peruana e Colombiana (Silva-Filho et al., 1997). Membro da família Solanaceae, o fruto desta planta se destaca como um importante recurso genético Amazônico e, com grande potencial para agroindústria por apresentar diversas formas de uso, seja in natura ou na forma de molho, doces e sucos (Silva-Filho, 1998). Ademais, também pode ser aproveitado para fins terapêuticos, visto que pode ser utilizado no controle do colesterol, diabetes e ácido úrico (Silva-Filho, 2009).

O *Solanum sessiliflorum* Dunal pertence ao grupo das Plantas Alimentícias Não Convencionais – PANCs, por ser uma planta desconhecida pela maioria das pessoas, mas com grande importância econômica e alimentícia que pode ser utilizada para proporcionar renda aos agricultores quando comercializada (Corrêa et al., 2022). Visto que os agricultores familiares se destacam como um dos principais detentores do material genético dessa planta em pequenas propriedades (Silva-Filho et al., 2005). No entanto, para que PANCs, como *Solanum sessiliflorum* Dunal possam ser reconhecidas e utilizadas na agricultura de subsistência é fundamental a realização de estudos que objetivem a análise de novos tecidos vegetais comestíveis, novas formas de consumo e novas maneiras de propagação dessas espécies (Leal et al., 2018).

Dada a importância de *Solanum sessiliflorum* Dunal, a fisiologia vegetal, uma das áreas de fundamental importância para a agricultura, tem se destacado no desenvolvimento técnicas inovadoras, como cultura de tecidos, para a propagação de plantas mais resistentes, uniformes e habilitadas para suportar condições ambientais adversas, sendo estes, um dos principais problemas enfrentados na propagação natural de *Solanum sessiliflorum* Dunal (Araújo et al., 2007).

Considerando esses aspectos, o presente trabalho torna-se relevante uma vez que a espécie é pouco estudada e ainda não possui muitos relatos utilizando a cultura

de tecidos vegetal, via organogênese. Desta maneira, estudos com cultura de tecidos em *Solanum sessiliflorum* Dunal, permitirão em um primeiro momento levantar as condições básicas para a indução da rota organogenética, elucidando as melhores combinações de concentrações de citocininas e auxinas, bem como, o potencial dos explantes. Futuramente, com um protocolo estabelecido e reproduzível, os materiais produzidos *in vitro* poderão ser utilizados para regenerar plantas transformadas geneticamente. Além disso, o estudo das respostas ecofisiológicas tem se mostrado como um eficiente meio de entender o efeito de variáveis ambientais sobre o comportamento das plantas.

Portanto, do ponto de vista acadêmico, esta pesquisa tem grande apreço no conhecimento da biologia do desenvolvimento vegetal e, também, ecofisiológico ao propor uma forma de propagar de maneira uniforme uma planta nativa da região amazônica com potencial econômico e nutricional para populações necessárias da cultura de subsistência.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

- Estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* do cubiu por organogênese a partir de diferentes explantes.

1.3.2 Objetivo específico

- Determinar o alongamento de brotações *in vitro*;
- Regenerar uma planta completa de cubiu a partir de pequenos fragmentos vegetais (explantes);
- Avaliar o efeito dos reguladores de crescimento na propagação *in vitro*, via organogênese.

1.4 Hipótese

O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), por ser uma espécie com limitações na conservação de germoplasma em seu ambiente natural, apresentará maior capacidade de conservação e desenvolvimento quando cultivado *in vitro*, via organogênese, e os fatores abióticos não se caracterizarão como um fator limitante para o desenvolvimento do vegetal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal)

O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é uma espécie pertencente à família Solanaceae. Essa planta, também conhecida como tomate de índio, apresenta-se, do ponto de vista biológico, como uma espécie silvestre. Domesticada pelos indígenas amazônicos, esse processo permitiu a produção de uma diversidade genética correspondendo a um banco de germoplasma de 30 etnovarietades (Silva-Filho, 2002). Essas etnovarietades mostram um polimorfismo tanto da parte vegetativa quanto reprodutiva da planta (Silva-Filho et al., 2005). Esse fato é importante sabendo que, pelo menos parcialmente, com variação genética natural de uma espécie em que diversidade biológica do pool genético da população responde de maneira distinta ao ambiente (Flood et al., 2011).

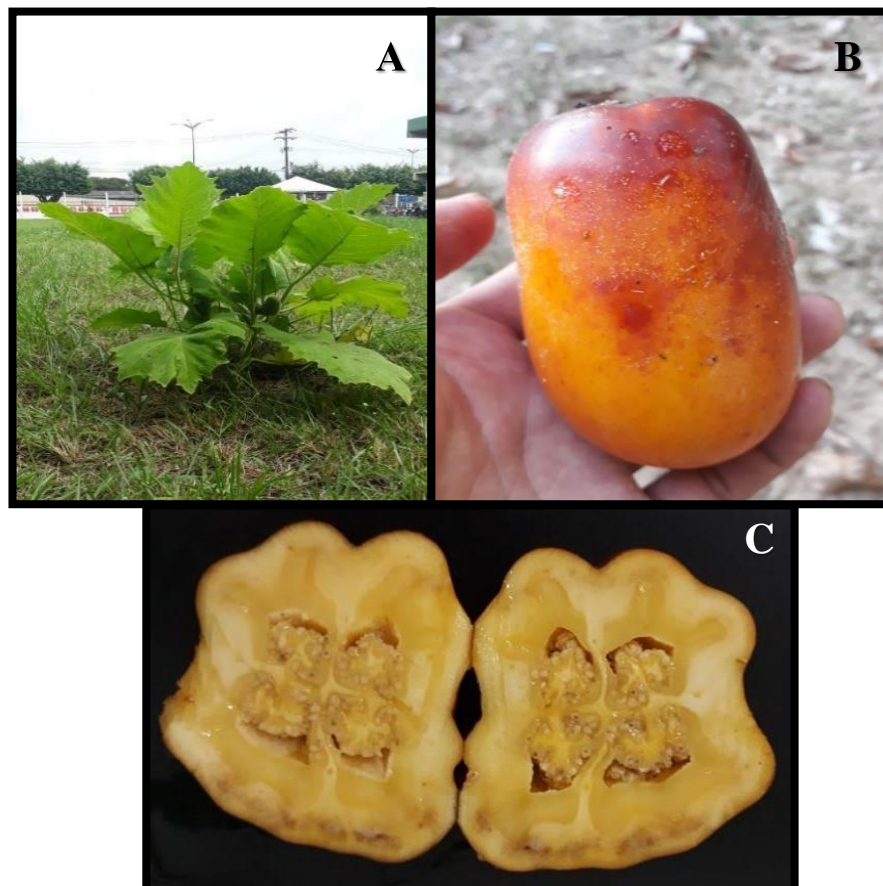


Figura 1: Características morfológicas de *Solanum sessiliflorum* DUNAL: (A) Detalhes da planta de cubiu; (B) Vista externa do fruto; (C) Vista interna do fruto com exposição das sementes.

Fonte: (Cordeiro, 2020).

Neste contexto, uma vez que as características fenotípicas são importantes na forma de responder ao ambiente, o estudo das diferentes etnovarietades de cubiu pode proporcionar avanços significativos no entendimento das interações ecofisiológicas da planta com o ambiente. Não obstante, o entendimento de como os polimorfismos genéticos podem ser expressos na tentativa de adaptar-se a mudanças ambientais ainda deve ser estudado (Henderson; Salt, 2017). Ademais, *Solanum sessiliflorum* Dunal é caracterizada como uma planta alimentícia não convencional (PANC) e devido ao alto valor nutricional em seus frutos pode ajudar, parcialmente, solucionar a produção de alimentos, ao menos regionalmente (Kinupp, 2007). No geral, fruto de *Solanum sessiliflorum* Dunal é rico em vitamina A e C, ferro, niacina dentre outros e pode ser consumida como suco, geleia ou in natura. Não obstante, o uso dessa espécie pelas indústrias cosmética e farmacêuticas é, também, bem disseminado (Rodrigues et al., 2013).

Apesar da qualidade nutricional presente em *Solanum sessiliflorum* Dunal e pelo fato de ser produzido em formato de agricultura de subsistência, caracterizada pela baixa produtividade e por alimentar pequenas comunidades, essa espécie permanece ainda pouco investigada com relação as suas características biológicas e, principalmente, relações ecofisiológicas. Talvez, a falta de informações e pesquisas com relação ao cultivo de *Solanum sessiliflorum* Dunal acentue para o baixo consumo e/ou conhecimento dessa planta até entre a população Amazônica. Portanto, promover estudos de ecofisiologia deve trazer luz a respeito do ciclo de vida, produtividade e interações biofísicas com ambiente de *Solanum sessiliflorum* Dunal.

Esse fato torna-se ainda mais relevante quando se posta que projetos populacionais indicam crescimento acelerado e contínuo nas próximas décadas, com população mundial em 2024 superior a 8 bilhões de pessoas e perspectiva de alcançar 10 bilhões até 2050 de acordo com relatórios das Nações Unidas (2017), segurança alimentar é, na verdade, um desafio para os próximos anos principalmente sabendo que cerca de dois bilhões de pessoas sofrem com deficiência nutricional (Tulchinsky, 2010). Para solucionar essa questão, contudo, é mais complexa se considerarmos que aumento na exploração de terras agrícolas, ao longo das últimas décadas, culminaram em um massivo dano no ecossistema (Ramankutty et al., 2018).

Sendo assim, foi criado no âmbito da Organização das Nações Unidas (ONU), os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), que ao todo são 17 e compõem uma agenda de ações (Agenda 2030), onde abordam assuntos referentes à

fome/pobreza, segurança alimentar e nutricional e o direito humano a alimentação adequada, no ambiente rural (Fontolan et al., 2022). De acordo com Paterniani (2001), a ciência aplicada à agricultura tem sido indispensável, não somente para aumentar a produtividade dos alimentos, mas também para reduzir, ou até mesmo eliminar danos ao meio ambiente, a partir de técnicas modernas e com elevadas taxas de produtividade. Diante disso, dentre as técnicas biotecnológicas existentes na atualidade, cultura de tecidos é uma das estratégias que tem propiciado resultados eficientes, práticos e de impacto para o melhoramento vegetal (Freitas; Bered, 2003).

2.1.1 Usos do cubiu

Os frutos do cubiu, são citados como importantes fontes nutricionais para os povos da região amazônica, a polpa é a parte comestível do fruto, possuindo em sua composição química fibras, proteínas, sais minerais e vitaminas, com alto rendimento da polpa e textura firme (Silva-Filho et al., 1997; Santos, 2005). Ademais, seu fruto é considerado um excelente produto, com sabor ácido, diferentes propriedades, alto teor de pectina e boas características nutricionais (Silva-Filho et al., 2005). Desse modo, uma de suas principais funções é a utilização no tratamento de diversas doenças como anemia, pelagra e, principalmente no controle dos níveis elevados de colesterol, ácido úrico e glicose no sangue (Pires et al., 2006).

A polpa do cubiu quando conservada possibilita a criação de várias receitas como: cubiu em calda, pães, pães com casca de cubiu, tucubiu (molho para caldeirada e pratos diversos, alternativa ao tucupi) e sorvetes (Carvalho, 2018). Eggea et al. (2020) criaram uma receita de bolo de chocolate na qual a farinha de trigo convencional foi substituída parcialmente pela farinha de cubiu, tal receita obteve aceitação a nível global para as misturas que continham de 15% a 20% da farinha de cubiu na preparação dos bolos, indicando seu potencial uso na substituição parcial a farinha de trigo. Furlaneto et al. (2015) testaram dois tipos de geleias (comuns e light) que continham em sua composição, a polpa de cubiu e, obtiveram resultados relevantes quanto a aceitação do produto que apresentava em sua composição 60% de polpa.

Os índios peruanos e brasileiros utilizam as folhas maceradas para a formulação de uma pasta, na qual é colocado sobre a pele para o tratamento de queimaduras. O suco da cavidade locular é utilizado para amenizar os sintomas da coceira provocada pela picada de insetos. O suco puro é utilizado pela população da

Amazônia brasileira, peruana e colombiana para controlar enfermidades relacionadas ao mau funcionamento dos rins e do fígado, sendo recomendada na dieta de pacientes com colesterol alto e diabéticos (Silva-Filho, 1998). Como cosmético, o cubiu serve para dar brilho aos cabelos devido a presença de algumas vitaminas e pectinas (Silva-Filho et al., 1996). Ademais, suas folhas, raízes e frutos são considerados excelentes produtos para a produção de medicamentos naturais, cosméticos e alimentos que podem ser utilizados em saladas juntamente com verduras e legumes (Augusto, 2020).

2.1.2 Potencialidade Econômica

A agricultura amazônica é composta por uma variedade de espécies, que impulsiona cada vez mais pesquisas acerca de suas potencialidades. Apesar disso, existem espécies ainda pouco conhecidas que podem representar alternativas econômicas importantes para os mercados regionais, nacionais e internacionais (Lopes; Pereira 2005). Neste contexto, o cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) se destaca devido as suas características, como rusticidade, capacidade produtiva, diversidade de utilização e propriedades nutricionais, o que o torna uma opção atrativa e com boa perspectiva para cultivo (Silva-Filho et al., 2013).

Sob o ponto de vista econômico, *S. Sessiliflorum* Dunal tem se constituído como uma importante matéria-prima para a agroindústria moderna, por reunir diferentes atributos que possibilitam sua exportação e cultivo. Geralmente, devido à grande concentração de pectina, os frutos são exportados para extração desta substância para uso industrial no setor de alimentos (Colodel et al., 2017). Assim, o cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), em especial os seus frutos possuem propriedades nutricionais importantes para a melhoria da saúde da população. Logo, esse potencial deve ser efetivamente divulgado como forma de inserção dessa fruta na alimentação cotidiana da sociedade (Pereira et al., 2012; Charrondièrre et al., 2013).

2.2 Cultura de Tecidos Vegetal

O início da pesquisa com cultura de tecidos vegetais surge no início dos anos 1900 quando Gottlieb Haberlandt apresentou sua hipótese sobre a capacidade intrínseca de células vegetais isoladas crescidas em meio nutritivo (Haberlandt, 1902).

A proliferação a longo prazo e a manutenção de tecidos de plantas cultivadas foram elaboradas durante a década de 1930 e forneceram provas experimentais para essa hipótese. Foi seguido pela observação de que os hormônios auxina e citocinina são ambos necessários para a proliferação celular *in vitro*. Além disso, foi revelado que a proporção desses hormônios determina a via morfogenética que o tecido cultivado *in vitro* seguirá: proporções altas e baixas de citocinina para auxina favorecem a regeneração de caule e raiz, respectivamente, enquanto concentrações mais balanceadas resultam em crescimento desorganizado de uma massa celular (Skoog; Miller, 1957).

Essa massa celular em proliferação foi denominada "calo" devido à sua semelhança com o tecido da planta que cicatriza feridas. No final da década de 1950, foi provado que, além da organogênese sequencial de explantes de raízes, plantas inteiras podem ser regeneradas a partir de células vegetais cultivadas em apenas uma etapa por meio da formação de embriões (Steward et al., 1970). Essa via foi posteriormente denominada "embriogênese somática" e seu início foi confinado a células individuais (Backs-Hüsemann; Einert, 1970). Este processo foi considerado a prova experimental da "totipotência" das células vegetais, que cada célula somática vegetal tem a capacidade de se regenerar em uma planta inteira.

2.3 Meio de Cultura

Na natureza, as plantas são seres autótrofos, ou seja, organismos capazes de produzir seu próprio alimento, no entanto, quando *in vitro* se faz necessária a utilização do meio de cultura, para obtenção de nutrientes como os sais minerais, água, gás carbônico, energia (luz), entre outros (Machado, 2005). Ademais, o cultivo realizado *in vitro* exige rigorosa assepsia, desta forma, o meio de cultura é caracterizado como uma medida importante para impedir a entrada de microorganismos indesejáveis e suprir as necessidades dos tecidos ou órgãos cultivados, garantindo o crescimento e desenvolvimento do vegetal (Pasqual et al., 1997).

O meio de cultura deve ser preparado de acordo com as necessidades e exigências da planta em estudo, para que dessa forma seja oferecido ao tecido vegetal as condições necessárias para o seu crescimento e desenvolvimento, pois, caso contrário, podem causar sintomas de deficiência mineral e conseqüentemente a senescência do explante (Santos-Serejo et al., 2006; Fick, 2007). Em estudos

realizados por Mantovani e Franco (1998), verifica-se uma grande variedade de meios de cultura adaptados para as mais diversas espécies vegetais, que se distinguem pela constituição e concentração de nutrientes. Geralmente os meios mais utilizados com espécies florestais são o MS (Murashige; Skoog, 1962) e o WPM (Woody Plant Medium), desenvolvido especialmente para espécies lenhosas (Lloyd; Mccown, 1981).

2.4 Aplicações da Cultura de Tecidos

Do ponto de vista tecnológico, cultura de tecidos vegetais possui aplicações em vários setores desde agricultura a conservação de recursos genéticos de espécies. No tocante a aplicações agrícolas, cultura de tecidos pode ser utilizada em diversas práticas, como produção de compostos com alto valor comercial (fármacos, cosméticos, alimentos), produção de plantas livres de patógenos (Garcia-Gonzales et al., 2010). Ademais, cultura de células e órgãos *in vitro* oferece uma fonte alternativa para a conservação de genótipos ameaçados (SENGAR et al., 2010). A conservação de germoplasma em todo o mundo está se tornando cada vez mais uma atividade essencial devido ao alto índice de estreitamento da base genética e a crescente necessidade de se preservar do patrimônio botânico e genético (Rech-Filho et al., 2005).

Protocolos de cultura de tecidos podem ser usados para preservação de tecidos vegetativos quando os alvos para conservação são clones em vez de sementes, para manter o histórico genético de uma cultura e evitar a perda do patrimônio conservado devido a desastres naturais, seja estresse biótico ou abiótico (Rech-Filho et al., 2005). As espécies de plantas que não produzem sementes (plantas estéreis) ou que têm sementes "recalcitrantes", possivelmente o cubiu, que não podem ser armazenadas por um longo período de tempo podem ser preservadas com sucesso por meio de técnicas *in vitro* para a manutenção de bancos de genes.

2.4.1 Ecológica

A biodiversidade caracteriza-se como uma estratégia importante, que pode proporcionar a humanidade atual e as futuras gerações, condições favoráveis de segurança alimentar, econômica e ecológica. No entanto, a manutenção dessa grande

diversidade de espécies vegetais, caracteriza-se como uma das principais preocupações mundiais, em função da exploração excessiva dos recursos naturais (Ribeiro; Rodrigues, 2006). À exemplo, são extraídos inúmeros produtos das espécies vegetais de grande importância econômica, como a madeira, biomassa e energia para as indústrias (Studart-Guimarães et al., 2003).

A Amazônia, por exemplo, é a região de maior biodiversidade do planeta, no entanto, o desmatamento nessa área, vem acontecendo em ritmo acelerado, o que tem sido ocasionado pelas ações antrópicas intensivas, assim, o desaparecimento de espécies vegetais de grande utilidade tradicional e econômica estão desaparecendo, juntamente com a oportunidade de uso sustentável desses recursos (Fearnside, 2006). Observa-se que somente os modelos de unidades de conservação da biodiversidade adotados no Brasil, não são suficientes para evitar o crescente desmatamento, extinção de espécies vegetais e sobretudo a perda da viabilidade genética na região amazônica, sendo fundamental que novas tecnologias sejam incorporadas aquelas já em uso (Barbosa, 2001).

Diante desse quadro, a utilização da biotecnologia vegetal caracteriza-se como uma ferramenta de grande valor para diversas categorias, pois pode ser utilizada para o desenvolvimento de métodos de conservação e proteção de espécies vegetais (Viana et al., 2014). Visto que os alimentos produzidos de modo sustentável, a partir da utilização de técnicas biotecnológicas como cultura de tecidos, são livres de agrotóxicos, protegem a biodiversidade, aperfeiçoam saberes e formas de produção tradicional (Brasil, 2014). No entanto, tem sido evidenciado que para compreender as funções ecológicas das florestas e sua importância para a sustentabilidade da vida no planeta, bem como, as possíveis consequências associadas a constante exploração dos recursos naturais, se faz necessário a elaboração de técnicas eficientes e de grande aplicação na preservação de espécies vegetais (Muralidharan; Kallarackal, 2005).

2.4.2 Agrônômica

Nos últimos anos a cultura de tecidos vegetais vem se destacando mundialmente em várias frentes do conhecimento científico e tecnológico. Principalmente, quando é levado em consideração a exploração em massa dos

recursos não renováveis, assim, um dos fatores primordiais para atender as demandas da humanidade, tem sido o estabelecimento de agriculturas cada vez mais sustentáveis, e que tenham como principal objetivo a preservação do meio ambiente, proporcionando segurança ao consumidor a partir do desenvolvimento de alimentos saudáveis e livres de patógenos (Carrer et al., 2010). Dessa forma, com a utilização de técnicas como a cultura de tecidos, mudas saudáveis provenientes de micropopulação podem ser produzidas e colocadas à disposição do agricultor (Santos; Rodrigues, 2004).

O botânico fisiologista Gottlieb Haberlandt, foi o pioneiro ao utilizar a técnica de cultura de tecidos no século XX, baseando-se no princípio de totipotência celular, firmando a ideia de que corpos inteiros poderiam ser formados a partir de uma única célula (Hartmann et al., 2018). Em razão disso, cultura de tecidos vem ganhando cada vez mais espaço no mercado, a partir da fabricação de mudas *in vitro* pelas biofábricas, ou seja, laboratórios que se dedicam a produção em larga escala de mudas uniformes e livres de agentes patogênicos, o que tem proporcionado grandes vantagens comerciais (Carvalho et al., 2012).

Hoje, a soja (*Glycine max*), por exemplo, é uma das plantas mais cultivadas em praticamente todo o território nacional, pois a partir do desenvolvimento de novas técnicas como a biotecnologia vegetal, novos cultivares foram produzidos, apresentando características mais resistentes as pragas e doenças, permitindo com que esta planta de grande importância econômica, suportasse ser cultivada em diferentes condições de solo e clima (Nogueira et al., 2015).

Dessa forma, a biotecnologia se caracteriza como uma ferramenta inovadora na produção em larga escala de espécies vegetais, e a cada ano vem se destacando e impulsionando o aumento da produtividade de plantas com características genéticas mais adaptadas as diferentes condições ambientais (Beer et al., 2009).

2.4.3 Terapêutica

As plantas medicinais apresentam vários tipos de princípios ativos que são utilizados com propósito terapêutico pelo homem há milhares de anos, e por esse motivo, nos dias atuais, estas plantas representam uma valiosa fonte de metabólitos secundários, os quais são utilizados principalmente pelas indústrias farmacêutica e

alimentícia (Rao; Ravishankar, 2002).

Sendo assim, a difusão do conhecimento tradicional permitiu que as plantas fossem positivamente selecionadas e muito do que se sabe hoje a respeito de tratamentos com plantas é resultante do conhecimento popular, mas apesar da evolução do conhecimento científico, a utilização de métodos alternativos de cura, ainda é frequentemente transmitido culturalmente (Rodrigues, 2005).

O Brasil é o país que abriga uma das maiores biodiversidades de plantas medicinais do mundo, no entanto, a exploração predatória e o desconhecimento das práticas de cultivo tem levado a reduções drásticas das populações naturais, ocasionando a perda de muitos metabólicos ainda não estudados pela Química e Farmacologia (Hostettman; Queiros; Vieira, 2003). Além disto, alguns dos principais problemas enfrentados na produção de plantas medicinais para a utilização terapêutica são, sem dúvida, a quantidade e a qualidade da matéria prima vegetal, logo, para evitar tais problemas, e sobretudo, evitar o extrativismo descontrolado, as indústrias vêm atuando no sentido de aumentar a quantidade e melhorar a qualidade dessa matéria-prima através do cultivo de plantas medicinais em larga escala (Siani, 2003).

Desta forma, a utilização de técnicas biotecnológicas, a exemplo, cultura de tecidos, torna-se uma ferramenta bastante útil para a reprodução de espécies com propriedades terapêuticas desejáveis para o tratamento de problemas de saúde (França, 2001). Visto que em plantas medicinais, a cultura de tecidos tem auxiliado na propagação clonal de diversos genótipos, permitindo a conservação do germoplasma vegetal, a obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células e na otimização da produção de metabólitos (Pletsch, 1998; Botta et al., 2001; Rao; Ravishankar, 2002; Arikat et al., 2004).

Estudos realizados anteriormente comprovaram que muitas plantas medicinais já são facilmente multiplicadas *in vitro*, tais como, *Aloe vera* (L.), que apresenta propriedades laxativas e cicatrizantes; *Egletes viscosa* (L.), antiespasmódica e anti-diarréica; *Artemisia annua* L., utilizada para tratamento contra malária (Pletsch, 1998; Diniz et al., 2003; Liu et al., 2004). Logo, a utilização de técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos, apresentam-se como um importante recurso alternativo para o cultivo de espécies vegetais e produção de metabólicos secundários, atuando como uma fonte biológica contínua para a produção de fármacos (Viana et al., 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biologia do Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente – IEAA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Para a indução da organogênese *in vitro* foram utilizadas sementes maduras de duas etnovarietades de cubiu (1 e 9), gentilmente fornecidas pelo Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas - INPA.

Este trabalho foi composto por dois experimentos: o primeiro referente à um estudo para avaliação da capacidade organogênica dos explantes de cotilédone e hipocótilo crescidos *in vitro* em diferentes tratamentos contendo citocininas e auxinas, e o segundo, para o cultivo do explante de hipocótilo em meio com diferentes concentrações de citocininas e auxinas, de modo a regenerar uma planta completa de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal).

3.1 Desinfestação e Germinação *in vitro* das Sementes

As sementes foram desinfestadas em capela de fluxo laminar, utilizando-se etanol 70% (v/v) por 1 minuto, seguido por imersão em hipoclorito de sódio comercial (2,5% v/v) com 2 gotas de Tween-20 a 0,1% (v/v), durante 15 minutos. Logo após, foi realizada uma tríplice lavagem em água deionizada estéril.

Após a desinfestação das sementes do experimento I em câmara de fluxo laminar, realizou-se a inoculação de cerca de três sementes em tubos de ensaio com aproximadamente 20 mL de meio cultura contendo sais de MS (Murashige; Skoog, 1962) meia força, complexo vitamínico B5 (Gamborg et al., 1968), 1,5 % (p/v) de sacarose, 0,005% (p/v) de mio-Inositole acrescido 0,25% (p/v) de agente geleificante ágar Sigma Chemical Company, EUA), pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Os tubos foram vedados com tampa rígida de polipropileno, após o preparo do meio. Anteriormente a adição das sementes, o meio foi autoclavado a 120 °C, 1,1 Pa por 20 minutos para esterelização.

A germinação das sementes ocorreu no escuro sob temperatura de 27 ± 2 °C, por um período de 8 dias. Após este tempo, os tubos foram transferidos para o ambiente iluminado com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por 2 lâmpadas de LED com 17W (Vilux®, 27 LLTV03, Brasil).

Após 30 dias, foram obtidos segmentos de cotilédone e hipocótilo para serem

utilizados como fonte de explante. Os explantes de cotiledone foram incubados com a face adaxial para cima e os segmentos de hipocótilo foram inoculados horizontalmente em frascos de 250 mL contendo 60 mL de meio MS, acrescido com vitaminas, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,100 mg L⁻¹ mio-inositol, 6 g L⁻¹ de ágar, pH 5,7 ±0,1.

Diferentes concentrações dos reguladores de crescimento citocininas e auxinas, foram adicionados ao meio básico resultando nos seguintes tratamentos: meio I) Controle (meio sem adição de fitohormônios); II) Cinetina 1 mg L⁻¹; III) BA 1 mg L⁻¹; IV) BA + cinetina (4,15 mg L⁻¹ + 2,5 mg L⁻¹); V) BA (4,15mg); VI) cinetina + BA + AIA. Após 30 dias foram avaliados explantes com calos (%), frequência de brotação (%), percentagem de explantes com folhas e emissão de raízes. Os melhores tratamentos foram repetidos e segmentos de hipocótilo apresentaram melhor resposta para serem utilizados na indução da organogênese no ensaio posterior.

3.2 Indução de Organogênese a Partir de Segmentos Hipocotilenonares de *Solanum sessiliflorum* Dunal

Com o auxílio de pinça e bisturí em condições assépticas, segmentos de hipocótilo de plântulas que cresceram por 30 dias nas condições descritas no item 3.1 foram extirpados para serem utilizados como fonte de explantes. Os segmentos de hipocótilo foram inoculados horizontalmente em frascos de 250 mL contendo 60 mL de meio MS, acrescido com vitaminas, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,100 mg L⁻¹ mio-inositol, 6 g L⁻¹ de ágar, pH 5,7 ± 0,1.

Diferentes concentrações dos reguladores de crescimento citocininas e auxinas, foram adicionados ao meio básico resultando nos seguintes tratamentos: meio I) controle (sem adição de fitohormônios); meio II) cinetina 1mg L⁻¹; meio III) BA 1 mg L⁻¹; meio IV) BA + cinetina (4,15 mg L⁻¹ + 2,5 mg L⁻¹); meio V) cinetina + BA + AIA. Após 30 dias foram avaliados explantes com calos (%), frequência de brotação (%), percentagem de explantes com folhas e emissão de raízes.

3.3 Delineamento e Análise Estatística

O experimento II foi constituído por 5 tratamentos (meio I, II, III, IV e V) com 6 repetições e cada parcela foi constituída por um frasco, contendo 15 segmentos cada.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para a comparação das médias dos tratamentos, foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desinfestação e germinação *in vitro* das sementes

A imersão das sementes em hipoclorito de sódio comercial (2,5% v/v) com 2 gotas de Tween-20 a 0,1% (v/v), durante 15 minutos, proporcionou maior segurança no controle do crescimento de microorganismos sem trazer prejuízos para a viabilidade das sementes. Observou-se que obtenção de planta matriz *in vitro*, foi fundamental para a execução dos experimentos, visto que os métodos convencionais de produção de plantas demandam um longo período de desenvolvimento, novas áreas de produção e apresentam crescimento lento.

Ademais, as chances de contaminação e dissiminação de pragas e doenças são maiores, não sendo viável para a utilização de mudas com a finalidade de explantes *in vitro*. Não obstante, Esses resultados reforçam que o fato da fonte doadora dos explantes, ter sido obtida *in vitro*, diminui as chances de contaminação durante a realização dos experimentos. De acordo com Erig e Fortes (2002), maiores taxas de contaminação são observadas quando são utilizadas plantas doadoras de explantes diretamente do campo.

Quanto a influencia da luz no desenvolvimento das sementes, verificou-se que a germinação do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é mais eficiente quando passa um período no escuro (8 dias) e logo em seguida transferida para o ambiente iluminado. Interessantemente, esse período em que as sementes permaneceram no escuro apresentou importância significativa no processo de germinação e desenvolvimento das sementes de ambas as etnovarietades analisadas, observou-se ainda maior alongamento da região hipocotiledonar e folhas bem desenvolvidas. Isso é interessante, visto que apesar do potencial para agroindústria moderna, são relativamente restritas as informações relacionadas a importância da luz na germinação *in vitro*, principalmente daquelas espécies que possuem sementes pequenas, como é o caso do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) (Estefanello et al., 2008; Ferreira; Borghetti, 2004).

A luz destaca-se entre inúmeros fatores, como um dos critérios mais importantes para o sucesso da produção de plantas *in vitro*, visto que participa ativamente dos processos metabólicos das plantas, sendo indispensável durante todas as fases do seu desenvolvimento (Gonçalves et al., 2023). De acordo com

Skirvin (1981), a utilização de plântulas germinadas *in vitro*, em condições assépticas, tornam-se mais vantajosas, por promover um ambiente livre de microorganismos. Contudo, é necessário a utilização de inúmeros produtos e procedimentos para a adequada desinfestação de explante, e para cada tipo de desinfestação, é necessário a elaboração de protocolos com diferentes concentrações de produtos e tempo de imersão, entre eles destacam-se álcool, hipoclorito de sódio e detergentes (Dutra et al., 2009).

Considerando o processo de desinfestação para obtenção de plantas matrizes *in vitro*, verificou-se que o controle de microorganismos é importante para a cultura de tecidos vegetal, mas as características fisiológicas do material vegetal devem ser mantidas, para posteriores estabelecimentos de metodologias com concentrações de hormônios vegetais e aplicação de técnicas de cultivo (Dutra et al., 2009; Schuch; Erig, 2005).

4.2 Indução de organogênese a partir de segmentos hipocotilenonares de *Solanum sessiliflorum* Dunal

Após 30 dias da inoculação dos explantes hipocotiledonares nos diferentes tratamentos, foi avaliado o desenvolvimento de calo, brotação, folha e raiz, nas regiões seccionadas dos hipocótilos. Cruz (2007) observou que hipocótilos dispostos na porção superficial do meio apresentaram organogênese direta, ao contrário dos demais que apresentaram respostas diferenciadas de acordo com a profundidade do explante de hipocótilo depositado no meio de cultura.

Neste experimento, a organogênese ocorreu de forma indireta em ambas as etnovarietades cultivadas nos meios de cultura contendo os seguintes tratamentos: meio I) controle (sem adição de fitohormônios); meio II) cinetina 1 mg L^{-1} ; meio III) BA 1 mg L^{-1} ; meio IV) BA + cinetina ($4,15 \text{ mg L}^{-1} + 2,5 \text{ mg L}^{-1}$); meio V) Drew força total (cinetina + BA + AIA). Verificou-se que os tratamentos (I,II,III e IV) desenvolveram brotações e folhas, no entanto, o tratamento (v), contendo Drew força total (cinetina + BA + AIA), resultou apenas no aparecimento de calos friáveis, de coloração branca.

Nicoli (2006), estudando a cinetina e sua interação com auxinas, observou que esta era fundamental para a proliferação de brotações. A melhor concentração foi a de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina, obtendo, em média 3 brotos por explante.

Ademais, aumento na produção de brotos de *Salix humboldtiana* foi observado com a adição de 0,5 mg L⁻¹ de cinetina (Pereira et al., 2000). Conforme Mishra et al. (1999) a utilização de 0,4 mg L⁻¹ de cinetina estimulou a formação de uma maior número de brotos e folhas por explante de *Emblica officinalis*.

Schuelter et al. (2009) verificaram maior produção de brotos adventícios em explantes de hipocótilo e ápices caulinares de *Solanum sessiliflorum* Dunal quando adicionaram 10 e 20 mg/L de cinetina, combinado com 0,02 mg/L IAA. Rezende (2008) conseguiu melhor resultado na obtenção de brotação em segmentos internodais durante a indução da organogênese *in vitro* de batata utilizando o meio WPM suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 5,0 mg L⁻¹ de ZEA. No entanto, durante a avaliação dos experimentos a emissão *in vitro* de brotação e folha, foi mais satisfatória a partir da utilização de segmentos de hipocótilo.

Ademais, as maiores médias, em todos os tratamentos avaliados, foram obtidas na (etnoveriedade 9) em meio de cultura contendo cinetina 1mg L⁻¹, seguido de BA + cinetina (4,15 mg L⁻¹ + 2,5 mg L⁻¹) para a (etnoveriedade 1) (Tabela 1). Por apresentar bons desempenhos em relação a formação de folhas mais alongadas e desenvolvidas os meios contendo cinetina 1mg L⁻¹ para a (etnoveriedade 9) e BA + cinetina para a etnoveriedade (1), foram considerados os melhores, dentre os tratamentos avaliados para indução *in vitro* de brotações a partir de segmentos de hipocótilo de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) (Tabela 1).

É importante mencionar que a menor frequência de brotações alongadas apresentadas nos tratamentos I, II, III e V, para a (etnoveriedade 1) e I, III, IV e V, para a (etnoveriedade 9), foi resultado da menor quantidade e comprimento de brotações formadas (tabela 1). O que contribuiu para a indicação dos meios cinetina 1mg L⁻¹ (etnoveriedade 9) e BA + cinetina (etnoveriedade 1) como melhores meios.

Nas duas etnoveriedades analisadas foram observadas respostas diferenciadas nos explantes de hipocótilo, avaliada a partir da frequência de calo, brotação, folha e raiz em cada um dos cinco tratamentos, conforme constatado na análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância (tabela 1). Grattapaglia e Machado (1998) afirmaram que as diferentes respostas nos meios de cultura provavelmente podem ser favorecidas pelo balanço hormonal endógeno presente no tecido vegetal utilizados como explante.

Tabela 1: Comparação do efeito das diferentes concentrações de citocininas e auxinas em seguimentos hipocotiledonar, nas etnovariedades 1 e 9 de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), a partir da percentagem de calo, brotações, folha e raiz em cada um dos 5 tratamentos analisados.

		Calo	Brotações	Folhas	Raiz
Controle	Etn1	1.3 ± 0.9 Ab	3.5 ± 2.2 Bb	1.5 ± 0.9 Bb	8 ± 0.5 Aa
	Etn9	0.2 ± 0.2 Bd	12.3 ± 0.5 Aa	8.5 ± 0.9 Ab	4 ± 1 Bc
BA	Etn1	3.7 ± 0.7 Ab	12.8 ± 0.9 Aa	3.8 ± 1.3 Bb	0 ± 0.0 Bc
	Etn9	5.8 ± 1.7 Ab	13.8 ± 0.5 Aa	8 ± 0.6 Ab	2 ± 0 Ac
Cinetina	Etn1	2 ± 1.1 Bc	10.3 ± 1.1 Aa	4.8 ± 0.9 Bb	0.8 ± 0.4 Bc
	Etn9	10 ± 1.1 Aa	13.8 ± 1.2 Aa	11.2 ± 1.5 Aa	3.2 ± 0.5 Ab
BA + Cinetina	Etn1	2 ± 1.2 c B	12.7 ± 0.9 a	7.7 ± 1.8 b	0 ± 0.0 d
	Etn9	12.7 ± 0.8 Aa	13.8 ± 0.7 a	10.8 ± 1.3 a	0.2 ± 0.2 b
Drew	Etn1	6 ± 1.2 Bb	12 ± 0.6 a	10 ± 0.9 a	0.3 ± 0.3 Ac
	Etn9	14.7 ± 0.3 Aa	0 ± 0 Bb	0 ± 0 Bb	0 ± 0 Ab

FONTE: Autoria própria

Os reguladores de crescimento são considerados substâncias fundamentais na composição do meio de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de organismos vegetais, dentre eles têm-se principalmente as auxinas, giberelinas e as citocininas (Cid; 2001). Estas últimas atuam na quebra da dominância apical dos brotos e no aumento da taxa de multiplicação (Erig; Schuch, 2006).

Além disso, estão envolvidas diretamente na divisão das células vegetais *in vitro* (Taiz; Zeiger, 2006) sendo, portanto, de fundamental importância para a diferenciação e regeneração de plantas em ambientes controlados. Dentro da classe das citocininas, estão os reguladores de crescimento BAP, 2iP e KIN que estão entre as mais comumente empregadas na cultura de tecidos, por serem eficientes no processo de multiplicação das estruturas aéreas e na indução de gemas adventícias em diversas espécies (Hu; Wang, 1983).

Com relação a formação de raízes, observou-se que os maiores percentuais de raízes foram verificados na (etnovarietade 9), em meio desprovido dos fitohormônios citocinina e auxina (Figura 1). Levando a inferir sobre uma possível reserva endógena natural de auxina no explante. Desso modo, a utilização de fitohormônios é dispensável uma vez que o surgimento de raízes ocorreu independente da sua utilização, diminuindo, assim, os custos com o processo de cultivo *in vitro*. Centellas et al. (1999) relataram que o estímulo ao desenvolvimento de raízes em explantes

cultivados *in vitro* é importante, contribuindo com o estabelecimento de plantas completas para posterior adaptação *ex vitro*, favorecendo, assim, seu desenvolvimento.

Lauria et al. (2023) evidenciaram que vários fatores influenciam o crescimento e a fisiologia das plântulas cultivadas *in vitro* e a luminosidade se destaca como o mais influente, assim, o uso de diodos emissores de luz (LEDs) pode modular a produção de metabólitos secundários fundamentais para as indústrias farmacêuticas e alimentícias. Sanderson e Simons (2014) na realização de cultivo de plantas *in vitro* demonstraram que a utilização de lâmpadas fluorescentes oferecem maior eficiência na conversão de energia elétrica em luz fotossinteticamente ativa do que as lâmpadas convencionais.

Logo, o cultivo de cubiu sob irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por 2 lâmpadas de LED com 17W, permitiu reduzir o custo de iluminação e ainda cultivar as plantas sob condições otimizadas de luz branca e irradiá-las com comprimentos de onda específicos o que pode contribuir para aumentar a produção de metabólitos secundários. Assim, estudos ecofisiológicos de plantas nativas, em especial, *Solanum sessiliflorum* Dunal, são fundamentais para a produção de mudas *in vitro*, pois haja vista a importância ambiental, nutricional e econômica desta espécie, faz-se necessário entender seu comportamento mediante diferentes formas de cultivo, por exemplo: disponibilidade de luz, meio de cultura adequado, via mais eficiente para propagação em larga escala, dentre outros contextos (Oliveira, 2014).

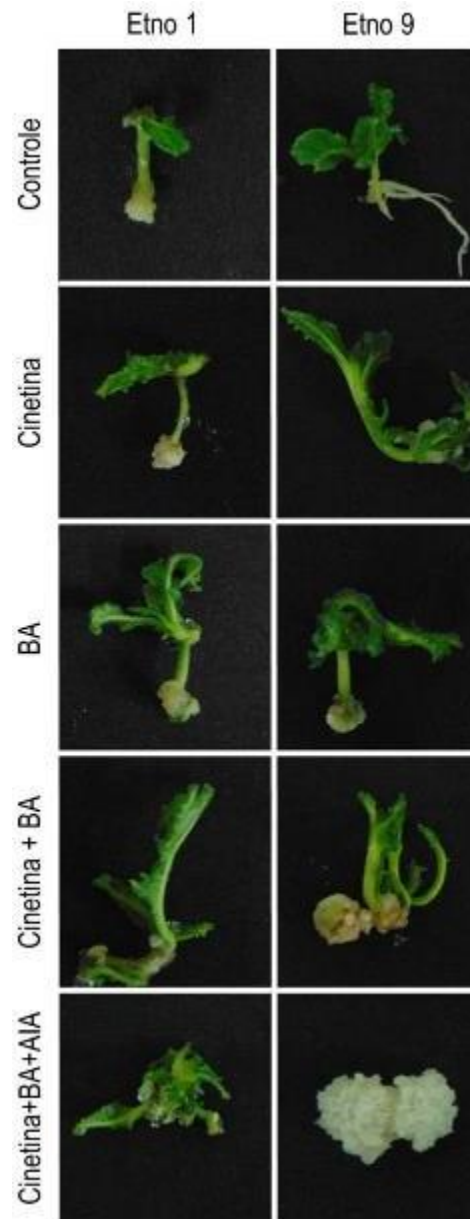


Figura 2: Organogênese de explantes hipocotiledonares de duas etnovariiedades de *Solanum sessiliflorum* Dunal, 30 dias após a inoculação dos explantes em meios de cultura contendo diferentes concentrações de citocinina e auxina.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que segmentos hipocotiledonares da planta *Solanum sessiliflorum* Dunal quando tratados com cinetina a 1 mg/L e uma combinação de BA (4,15 mg/L) e cinetina (2,5 mg/L), são mais eficientes na indução de brotações *in vitro* em cubiu. Esses tratamentos resultaram em maior alongamento e uma percentagem mais elevada de brotação, abrangendo ambas as etnovariedades.

O meio suplementado com Drew força total proporciona maior formação de calos para a etnovariedade 9. No entanto, visto que a calogênese está positivamente relacionada com a formação de brotos, possivelmente, com um período maior que 30 dias seja possível observar maiores resultados nesse tratamento.

Embora neste trabalho se tenha obtido efetivo conhecimento ecofisiológico quanto a propagação *in vitro* via organogênese de *Solanum sessiliflorum* Dunal, ainda existem muitas possibilidades de explorar a cultura de tecidos vegetal na propagação *in vitro* desta espécie. Sugere-se, por exemplo, a realização de mais experimentos em outras situações de cultivo, com outras fontes de explante e diferentes combinações de reguladores de crescimento, a fim de melhorar a eficiência da organogênese *in vitro*, assegurando, assim, formas mais alternativas para a utilização sustentável desta espécie nativa.

6 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade	1º sem 2022	2º sem 2022	1º sem 2023	2º sem 2023	1º sem 2024
Revisão de literatura	X	X	X	X	
Obtenção de créditos	X	X			
Exame de qualificação			X		
Proeficiência			X		
Germinação das sementes			X		
Indução de explantes do meio I, II e III			X		
Indução de explantes do meio I, IV e V			X		
Avaliação da organogênese				X	
Avaliação da formação de brotos, raízes, calos e folhas				X	
Análise estatística					X
Submissão/ publicação de artigo					X
Entrega da dissertação					X
Defesa					X

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, DOCUMENTOS 58, p. 1-16, 2002.

Arnaldos, T. L. et al. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, n. 3, p. 315-322, 2001.

Araújo, P. G. L. et al. Beta - caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 104-107, 2007.

Arikat, N. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 193-202, 2004.

Backs-Hüsemann, D.; Reinert, J. Embryobildung durch isolierte Einzelzellen aus Gewebekulturen von *Daucus carota*. **Protoplasma** v. 70, n. 1, p. 49-60, 1970.

Barbosa, F. B. C. A biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 69-94, 2001.

Beer, L. L. et al. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n.3, p.264-71, 2009.

Botta, B. et al. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p. 354 – 379, 2001.

Borman, C. H. Micropropagation and somatic embryogenesis. In: Hayward, M. D.; Bosemark, N. O.; Romagosa, I. **Plant breeding: principles and prospects**. Cambridge: Chapman and Hall, v. 93, n. 1, p. 2019-2020, 1993.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde.** – 2. ed., 1. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, p. 156, 2014.

Carvalho, A. C. P. P.; Rodrigues, A. A. J.; Santos, E. O. Produção de mudas micropropagadas no Brasil. **Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo de divulgação de mídia (INFOTECA-E)**, 2012.

Carvalho, L. G. **Estabilidade de polpa congelada de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal): avaliação físico-química e sensorial.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias: Agronomia, com área de concentração em Agricultura no Trópico Úmido) – Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Manaus, 2018.

Carrer, H.; et al. Biotecnologia na agricultura. **Estudos avançados**, v. 24, p. 149-164, 2010.

Centellas, A. Q.; Fortes, G. R. L.; Müller, N. T. G.; Zanol, G. C.; Flores, R.; Gottinari, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 181-186, 1999.

Cid, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Bio-tecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.19, p. 16-21, 2001.

Corrêa, C. N. et al. Conhecimento e uso de Plantas Alimentícias Não Convencionais na Amazônia. **Etnobiología**, v. 20, n. 2, p. 4-19, 2022.

Cruz, J. F. et al. Cubiu (*solanum sessiliflorum*): Uma fruta alimentar, medicinal e cultural. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 1, p. 93-107, 2023.

CRUZ, A. C. F. Universidade Federal de Viçosa. **Propagação *in vitro* do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) a partir de explantes juvenis e adultos.** p. 1-85, 2007

Diniz, J. D. N. et al. Ácido giberélico (GA3) e 6 - benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela *Egletes viscosa*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 934-8, 2003.

Dutra, L. F. et al. **A micropropagação de eucalipto. Pesquisa Florestal Brasileira.** Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.

Eggea, V. et al. Desenvolvimento e aceitabilidade de bolo de chocolate acrescido de farinha de maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Research, Society and Development.** v. 9, n. 2, 2020.

Erig, A. C.; Schuch, M. W.. Ação da 6-Benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy e Mastergala. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 12, n. 2, 2006.

Farias, P. M. **Estudos preliminares do protocolo de micropropagação do pinhão-manso (*Jatropha curcas*).** 2008. Monografia. (Concurso Catarinense de Monografias sobre Energias Renováveis e Eficiência Energética) – Instituto IDEAL, Tubarão.

Erig, A. C.; Schuch, M. W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*malus domestica* borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 575- 58, 2004.

Fearnside, P. M. Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. **Acta amazônica**, v. 36, p. 395-400, 2006.

Ferreira, A. G.; Borghetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado.** Artmed Editora, 2004. p. 323.

Fernando, J. A. et al. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of Passiflora. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, n. 1, p. 37-44, 2007.

Fick, T. A. **Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (LOURO-PARDO).** 2007. 50f. Dissertação (Mestrado) –

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2007.

Fontolan, M. V. et al. ODS 2: fome zero e agricultura sustentável no contexto rural. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 29, n. 0, p. 1-13, 2022.

Furlaneto, K. A. et al. Elaboração e aceitabilidade de geleia convencional e light de maná cubiu. **Nativa**. v. 3, n. 4, p. 276-280, 2015.

França, S. C. **Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.) Farmacognosta: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2001. p.105-204.

Cavalli, S. S. et al. **Variabilidade genética em populações naturais**. Freitas, L. B; Bered, F. Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: UERGS, p. 165-176, 2003.

Garcia-Gonzales, R. et al. Cultura de tecidos vegetais: Situação atual, oportunidades e desafios. **Ciência e investigação agrária**, v. 37, n. 3, p.5-30, 2010.

García-Forteza, E. et al. Protocolo de organogênese altamente eficiente baseado em ribosídeo de zeatina para regeneração *in vitro* de berinjela. **Biologia vegetal BMC** , v. 1, p. 1-16, 2020.

Grattapaglia D.; Machado M. A. **Micropropagação**. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas** (Torres A. C; Caldas L. S; Buso J. A.). EMBRAPA-CNPQ, Brasília, p. 183-247, 1998.

Gonçalves, D. S. et al. Effect of light spectra on in vitro multiplication, elongation and adventitious rooting stages of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl. **Advances in Bamboo Science** v. 1, n. 4, p. 1-10, 2023.

Haberlandt, G. Culturversuehe mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math. **Naturwiss.** v. 111, n.1, p. 69–92,1902.

Henderson, I. R.; Salt, D. E. Natural genetic variation and hybridization in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 5415-5417, 2017.

Hartmann, H. T. et al. Plant propagation: principles and practices. 9.ed. **New Jersey: Prentice Hall**, p.1024, 2018.

Hu, C. Y., Wang, P.J. **Meristem shoot tip and bud cultures**. In: EVANS, D.A. et al. Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breedings. New York, Mac-Millan, v. 1, p. 117-227. 1984.

Kinupp, V. F. **Plantas alimentícias não-convencionais da Região Metropolitana de Porto Alegre**, RS. 2007. 562 f. Tese - (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

Krug, M. G. Z. et al. Organogênese in vitro em cotilédones de melancia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 861-865, 2005.

Lauria, G. et al. Supplemental red light more than other wavebands activates antioxidant defenses in greenhouse-cultivated *Fragaria x ananassa* var. Elsanta plants. **Scientia Horticulturae**, v. 321, p. 112319, 2023.

Leal, M. L. et al. Conhecimento, uso e desuso de plantas alimentícias não convencionais. **Jornal de etnobiologia e etnomedicina**, v.14, n.1,p.1-9,2018.

Liu, C. Z. et al. *Artemisia judaica* L.: micropropagation and antioxidant activity. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.63-71, 2004.

Lloyd, G. B.; Mccown, B.H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot-tip culture. **Combined proceedings/ International Plant Propagators' Society**, v. 30, n.1, p.421-427,1981.

Lopes J. C.; Pereira, M. D. Germinação de sementes de cubiu em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p.146-150, 2005.

Machado, R. P. **Micropopagação do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal)**. 2005. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agricultura e sustentabilidade na Amazônia, Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2005.

Mantovani, N. C.; Franco, E. T. H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: Centro de Pesquisas Florestais, UFSM, v.12, p.132, 1998.

Mroginski, L. et al. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: Echenique, V. et al. **Biotecnología y mejoramiento vegetal**. INTA: Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, 2004. p.35-42.

Mishra, M. et al. Studies on micropopagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture, Chaubattia**, v.31, n. 3/4, p.116-122, 1999.

MÜHLBACH, Hans-Peter. Use of plant cell cultures in biotechnology. **Biotechnology annual review**, v. 4, p. 113-176, 1998.

Murashige, T.; Skoog, F. A. A. revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

Muralidharan, E. M; Kallarackal, José. Tendências atuais em biotecnologia de árvores florestais. **Biotecnologia vegetal e marcadores moleculares** , p.169-182, 2005.

Nicoli, P. M. **Micropopagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] – Fabaceae**. 2006. 89p. Dissertação (Mestrado em agronomia/ Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Noda, H.; Noda, S. N. Conservação e melhoramento in situ: Contribuindo para a preservação do conhecimento tradicional. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p.13-18, 2004.

Nogueira, A. P. O. et al. Avanços no melhoramento genético da cultura da soja nas últimas décadas. **Doenças da soja: Melhoramento Genético e Técnicas de Manejo**. Campinas: Millennium Editora, p. 159-178, 2015.

Oliveira, M. K. T. **Estudos ecofisiológicos com mudas de *Erythrina velutina***. 2014. 186f. Tese (Doutorado em Fitotecnia: Agricultura Tropical) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2014.

Pasqual, M. et al. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. Lavras, Brasil, 1998.

Paterniani, E. Agricultura sustentável nos trópicos. **Estudos avançados**, v. 15, p. 303-326, 2001.

Pereira, M. C. et al. Characterization and antioxidante potential of Brazilianfruits from the Myrtaceae Family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. .1, p. 3061-3067, 2012.

Pires, A. M. B. et al. Caracterização e Processamento de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). **Revista CERES**, v. 53, n. 307, p. 309-316, 2006.

Pletsch, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 4, p. 12-15, 1998.

Rao, S.; Ravishankar, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotecnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.

Rezende, R. K. S. et al. Organogênese in vitro de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Atlantic visando transformação genética. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1055-1064, 2013.

Rodrigues, V. G. S. **Cultivo, Uso e Manipulação de Plantas Medicinais**; Embrapa-EMPRES: Rondônia, v. 1, p. 1–25, 2004.

Rech-Filho, A. et al. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, n.1, p. 1799-1808, 2005.

Ribeiro, T. P. S.; Durigan, M. F. B. Produtos alimentícios a base de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) como oportunidade a agroindústria. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v.11, n.1, p. 241-250, 2018.

Ribeiro, R. A.; Rodrigues, F. M.. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

Richardson, K. A. et al. Transformação genética do trevo ocidental (*Trifolium occidentale* D. E. Coombe.) como modelo para genômica funcional e introgressão transgênica em espécies leguminosas clonais de pastagens. **Plant Methods**, v. 9, n. 25, p. 1-11, 2013.

Rodrigues, E.; Mariutti, L.; Mercadante, A. Carotenoids and Phenolic. Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 3022-3029, 2013.

Sanderson, S. W.; Simons, K. L. Light emitting diodes and the lighting revolution: The emergence of a solid-state lighting industry. **Research Policy**, v. 43, n. 10, p. 1730-1746, 2014.

Santos, R. D. Farmacologia da niacina ou ácido nicotínico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 85, n. 5, p.17-19, 2005.

Santos, C. C. C.; Rodrigues, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia**, v. 63, p. 201-205, 2004.

Santos-Serejo, J. A.; Junghans, T. G.; Soares, T. L.; Silva, K. M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: Souza, A. S.; Junghans, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Tropical, v. 1, n. 1, p. 131-140, 2006.

Siani, A. C. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos plataforma metodológica: relatório PPA/MCT 2000-2003. In: **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos plataforma metodológica: relatório PPA/MCT 2000-2003**. 2003. p.98

Sengar, R. S. et al. Present status and scope of floriculture developed through different biological tools. **Research Journal of Agricultural Sciences**, v.1, n. 4, p. 306-314, 2010.

Silva-Filho, D. F. Domesticação e melhoramento de hortaliças amazônicas. In: Borem, A.; Lopes, M. T. G.; Clement, C. R. **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa, MG: Editora da Universidade Federal de Viçosa. p. 461-486. 2009.

Silva-Filho, D. F. **Manual técnico Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal): Cultivo y utilización**. 2 ed. Caracas: Secretaria Pro-Tempore, v. 1, p. 114, 1998.

Silva-Filho, D. F. et al. Variabilidade genética em populações naturais de cubiu da Amazônia. **Horticultura Brasileira**. v. 35, n. 1, p.9-14, 1996.

Silva-Filho, D. F. et al. Cultivares de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) para a olericultura sustentável da Amazônia. In: Pesquisas Agronômicas para a agricultura sustentável na Amazônia Central / Hiroshi Noda, Luiz Augusto de Souza, Danilo Fernandes da Silva Filho. Manaus, AM: **Wega**., 2013. p. 27-42.

Silva-Filho, D. F.; Anunciação Filho, C. J.; Noda, H; Reis, O. V. Seleção de caracteres correlacionados em cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) empregando a análise de trilha. **Acta amazônica**, v. 27, n. 4, p. 229-240, 1997.

Silva-Filho, D. F. et al. Caracterização e avaliação do potencial agronômico e nutricional de etnovarietades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. **Actaamazônica**, v. 35, n. 4, p. 399-406, 2005.

Souza, J. C.; Rescarolli, C. L. S.; Nunez, C. V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**. v.12, n. 3, p. 269-280, 2018.

Sugiyama, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 61-64, 1999.

Skoog, F.; Miller, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.11, n. 1, p. 118-130, 1957.

Stefanello, S. et al. Germinação de sementes armazenadas de cubiu sob diferentes condições de luz. **Scientia agraria**, v. 9, n. 3, p. 363-367, 2008.

Steward, F.C. et al. Growth and development oftotipotent cells. **Annals of Botany**. v. 34, p. 761-787, 1970.

Schuelter, A. R. et al. A *In vitro* regeneration of cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal, Solanaceae) cultivars for comercial production. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 3, p. 963-975, 2009.

Schimpl, F. C. et al. Physiological responses of young Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) plants to drought stress and subsequent rewatering. *Flora*, v. 252, p. 10-17, 2019.

Studart-Guimarães, C. et al. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, p. 167-178, 2003.

Schuch, M. W.; Erig, A. C. Micropropagação e plantas frutíferas In: Fachinello, J. C.; Hoffmann, A.; Nachtigal, J. C. Propagação de plantas frutíferas. Brasília-DF: Embrapa Informações Tecnológica , p.155-173, 2005.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 3ª ed., 2006. 720 p.

Taiz, L.; Zeiger, E.; Møller, I. M.; Murphy, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

Yuyama, L. K. O. et al. Desenvolvimento e aceitabilidade de geleia dietética de cubiu (*Solanum sessiflorum* Dunal). **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 28, n. 4, p. 929-934, 2008.

Viana, V. R. C. et al. Produção de 4- NEROLIDILCATECOL em suspensões celulares de *Pothomorphe umbellata* L. MIQ. (Piperaceae). **Plant Méd**, v.9, n.1, 2014.