

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL**

**MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE CAMAPÚ
(*Physalis angulata* L.)**

JUCÉLIA OLIVEIRA VIDAL

MANAUS – AMAZONAS
2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL**

JUCÉLIA OLIVEIRA VIDAL

**MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE CAMAPÚ
(*Physalis angulata* L.)**

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

V648m Vidal, Jucélia Oliveira

Micropropagação e aclimatização de camapú (*Physalis angulata* L.) /
Jucélia Oliveira Vidal. - Manaus: UFAM, 2008.

61 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) — Universidade
Federal do Amazonas, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Orientador: Eduardo Ossamu Nagao

1. *Physalis angulata* L. 2. Proliferação de brotos 3. Substratos I.
Nagao, Eduardo Ossamu II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 582.951.4(043.3)

JUCÉLIA OLIVEIRA VIDAL

MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE CAMAPÚ
(*Physalis angulata* L.)

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

Aprovada em 23 de outubro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

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

Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me ajudar muito nos momentos difíceis, me dando força para superar as dificuldades do curso, e por iluminar meus caminhos;

Aos meus familiares que contribuíram para o meu sucesso nesta pós-graduação; em especial a minha filha, por ter me dado muitas alegrias nos momentos difíceis.

À Universidade Federal do Amazonas, principalmente a Faculdade de Ciências Agrárias pela oportunidade de realização do curso;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio;

Ao professor Eduardo Ossamu Nagao, pela orientação e ensinamentos;

Aos colegas do curso de Agronomia Tropical e do Laboratório Cultura e Tecidos Vegetal pelo companheirismo e ajuda mútua.

RESUMO

O camapú (*Physalis angulata* L.), pertencente à família Solanaceae, é uma erva anual de origem cosmopolita que se destaca por apresentar excelente potencial agroindustrial e farmacológico. Assim como a maior parte das espécies medicinais o camapú vem sendo coletado por processos extrativos e o material vegetal colhido é heterogêneo e de baixa qualidade. O presente estudo objetivou estabelecer uma metodologia eficiente de micropropagação *in vitro* e conseqüentemente para produção de mudas comercial. Segmentos nodais de camapú, contendo até duas gemas axilares, com 1 a 1,5 cm de comprimento foram retirados das plantas mantidas *in vitro* e inoculadas em meio MS, acrescido de 3% de sacarose e 0,7% de ágar. Os brotos adventícios oriundos de explantes inoculados em meio MS acrescido de 3% de sacarose e com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) e IAA (0; 0,5; 1,5 e 3,0 mg L⁻¹), apresentaram um melhor desenvolvimento no meio MS isento de BAP e AIA. Verificou-se ainda que os brotos adventícios oriundos de explantes inoculados em meio MS modificados nas concentrações de nitrogênio inorgânico total (0; ¼; ½; 1 e 2 mg L⁻¹) e sacarose (0; 7,5; 15; 30 e 45 g.L⁻¹) não apresentaram diferenças significativas nas concentrações ½ MS e 1MS. Na fase de aclimatização em casa de vegetação com nebulização intermitente e sombreamento de 50%, o substrato contendo a mistura de vermiculita + terriço de mata (1:1 v/v) promoveu um maior índice de sobrevivência e desenvolvimento das plantas.

Palavras chaves: *Physalis angulata* L.; Proliferação de brotos; Substratos.

ABSTRACT

Camapú (*Physalis angulata* L), belonging belongs to the Solanaceae family, is an annual herb of comopolite origin that stands out for presenting excellent agronomy and pharmaceuticals. As well as most of the medicine species camapú comes being collected through extrative processes and the harvested vegetal material is heterogeneous and low quality. The present study proposes to establish an efficient methodology of micropropagation *in vitro* and for commercial production of changes. Camapú segments nodal contend untill two axillary egg yolks and with 1 'till 1,5 cm of length had been restrained from plants kept *in vitro* and inoculated in MS medium, with pH adjusted for 5,7 before the inclusion of 0,7% aga dissolved by heating. The plantlets adventitious sprouts of explants inoculated MS medium increased 3% of sucrose and supplemented with different concentrations of BAP (0; 0,5; 1,5; 2,5;5,0 mg.L⁻¹) and IAA (0; 0,5; 1,5; 3,0 mg L⁻¹), had better presented development in MS medium exempt IAA and BAP. It was verified that the plantlets adventitious sprouts of explantes inoculated in MS medium modified in the inorganic nitrogen concentrations (0; ¼; ½; 1 e 2 MS) and sucrose (0; 7,5; 15; 30 e 45 g.L⁻¹) had not presented significant differences in the concentrations ½ MS and 1MS. In the acclimatization phase in greehouse with intermittent nebulizacion and 50% of shady, the substrates contend the mixture from vermiculite + florest soil (1: 1 v/v) promoted a bigger index of survival and development of the plants.

Key words: *Physalis angulata* L.; Proliferation of sprouts, Substrates

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Característica da espécie.....	15
2.1.1 Origem e distribuição geográfica	15
2.1.2 Aspectos botânicos	16
2.1.3 Potencialidade econômica	17
2.2 Micropropagação	18
2.2.1 Organogênese	19
2.2.2 Meio de cultura.....	20
2.2.3 Reguladores de crescimento	22
2.3 Aclimatização	23
2.3.1 Substrato	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Micropropagação de camapú.....	27
Experimento 1: Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e 3-ácido indolacético (AIA) para proliferação de brotos a partir de segmentos nodais de camapú.	28
Experimento 2: Efeito da concentração de sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a proliferação de brotos adventícios a partir de segmentos nodais de camapú.....	29
3.2 Substratos para aclimatização de plantas micropropagadas de camapú.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e 3-ácido indolacético (AIA) para multiplicação de brotos adventícios a partir de segmentos nodais de camapú	31

4.2 Efeito da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação de brotos a partir de segmentos nodais de camapú.....	40
4.3 Substratos para aclimatização de plantas micropropagadas de camapú.....	47
5 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição geográfica do camapú (<i>Physalis angulata</i> L.)	15
Figura 2 - Camapú (<i>Physalis angulata</i>). A - Planta, B - Flor, C - Fruto imaturo, D - Fruto maduro	17
Figura 3- Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) no comprimento médio dos brotos de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.)	32
Figura 4 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) no número médio de folhas de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.)	33
Figura 5 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) no número médio segmentos de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.)	33
Figura 6 - Formação de brotos de camapú. A. meio MS ausente de reguladores de crescimento, B e C. meio MS com diferentes níveis de reguladores de crescimento (BAP e AIA).....	34
Figura 7 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) no número médio dos brotos > 1cm de comprimento de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.).....	35
Figura 8 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) na formação de raízes em brotos de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.).....	36
Figura 9 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento BAP e AIA no número médio de botões florais em brotos camapú (<i>Physalis angulata</i> L.)	37
Figura 10 - Brotos adventícios em estágio produtivo de camapú <i>in vitro</i> A – emissão de botões florais, B - disposição de flor no broto, C - formação de frutos em broto.....	38
Figura 11 - Antocianina em plântulas de camapú. A - detalhe da base da plântula, B - detalhe da parte aérea da plântula.	39
Figura 12 - Comprimento médio de brotos emitidos por explantes de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.), aos 40 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio	41
Figura 13 - Número médio de segmento nodais emitidos por explantes de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.), aos 40 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio	42
Figura 14 - Número médio de folha emitidos por explantes de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.), aos 40 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio.....	42

- Figura 15 - Número médio de botões florais emitidos por explantes de camapú (*Physalis angulata* L.), aos 40 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio43
- Figura 16 - Brotos em estágio produtivo de camapú *in vitro* A. detalhe da emissão de botões florais, B. detalhe da disposição de flor em brotos adventícios.44
- Figura 17 - Número médio de raízes emitidas por explantes de camapú (*Physalis angulata* L.), aos 40 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio.....45
- Figura 18 - Aspecto visual do efeito das diferentes combinações de sacarose e nitrogênio no desenvolvimento de explantes de camapú (*Physalis angulata* L.), aos 40 dias de cultivo *in vitro*. S = sacarose, MS= meio Murashige & Skoog.46
- Figura 19 - Efeito do substrato sobre a sobrevivência de plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)48
- Figura 20 - Efeito do substrato sobre as médias do tamanho das plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....49
- Figura 21 - Efeito do substrato sobre o número médio de folhas das plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....50
- Figura 22 - Efeito do substrato sobre a emissão média de botões florais por planta de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)50
- Figura 23 - Efeito do substrato sobre o comprimento médio da maior raiz nas plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....51
- Figura 24 - Efeito do substrato sobre as médias da matéria fresca das plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tratamentos com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e 3-ácido indolacético (AIA) adicionado ao meio Murashige & Skoog (1962) para diferenciação de gemas e proliferação de brotos em explantes de <i>Physalis angulata</i> L. UFAM, Manaus, 2007. T= tratamento.	28
Tabela 2 - Tratamento com diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico e sacarose adicionado ao meio Murashige & Skoog (1962) para diferenciação de gemas e proliferação de brotos em explantes de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.) UFAM, Manaus, 2007. T= tratamento.	29
Tabela 3 - Resumo da análise de variância do efeito de níveis de BAP e AIA na proliferação de brotos de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.) UFAM, Manaus, 2007.	31
Tabela 4 - Resumo da análise de variância do efeito de níveis de Sacarose e Nitrogênio na proliferação de brotos de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.) UFAM, Manaus, 2008.	40
Tabela 5 - Resumo da análise de variância do efeito dos substratos na proliferação de brotos de camapú (<i>Physalis angulata</i> L.) UFAM, Manaus, 2008.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	ácido indolacético
BAP	Benzilaminopurina
MS	meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)
$\frac{1}{2}$ MS	meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962), com a concentração de nitrogênio inorgânico reduzido á 50%
$\frac{1}{4}$ MS	meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962), com a concentração de nitrogênio inorgânico reduzido á 25%
2MS	meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962), com a concentração de nitrogênio inorgânico dobrada
WPM	“Woody Plant Médium” meio de cultura de LLOYD e McCOWN (1980)
v/v	volume/volume

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre as plantas medicinais tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. Remotas civilizações primitivas se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo

A procura do mercado mundial por produtos de origem natural, em substituição aos sintéticos, aumentou consideravelmente nos últimos anos (SIMÕES, 2000) e, para atender ao tripé: eficácia, segurança e qualidade (SILVA, 2005), têm-se verificado, paralelamente, um aumento nos estudos correlacionados à avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus metabólitos secundários (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

O camapú (*Physalis angulata* L), pertencente à família Solanaceae, é uma erva anual de origem cosmopolita que se destaca por apresentar excelente potencial farmacológico e agroindustrial.

As plantas medicinais, em sua grande maioria, são coletadas em habitat natural e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade não são suficientes para atender uma demanda constante e ininterrupta, principalmente quando a espécie tem múltiplos usos. Apenas o cultivo sistematizado pode garantir produção regular e em larga escala (GULLO, 1998).

A micropropagação constitui uma alternativa para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal. Essa técnica é aplicada em plantas medicinais, aromáticas e inseticidas, visando, não só, à propagação de genótipos superiores como à produção de metabólitos secundários.

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis, as quais, mediante investigações experimentais, conduzem à determinação de protocolos ideais.

Devido à reduzida literatura a respeito de cultivo *in vitro* de camapú, tornam-se necessárias pesquisas sobre essa espécie, relacionadas à sua micropropagação e potencialidades para programas de melhoramento genético, no que se refere à obtenção de mudas selecionadas.

Mediante a este contexto o presente estudo teve como objetivo geral estabelecer uma metodologia eficiente de micropropagação *in vitro* e conseqüentemente produzir mudas de camapú em larga escala para fins comerciais; e os objetivos específicos foram: i) avaliar os efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento *in vitro* de brotos de camapú; ii) determinar concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico que propicie alta taxa de multiplicação de camapú; e iii) selecionar substratos para a aclimatização de plantas de camapú produzidas *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Característica da espécie

2.1.1 Origem e distribuição geográfica

O camapú (*Physalis angulata* L.) encontra-se distribuído em regiões tropicais e temperadas do mundo (Figura 1). No Brasil, pode ser encontrado em quase todo o território, podendo ser considerado como planta invasora de outras culturas (CORRÊA, 1984). De acordo com Cavalcante (1996) é uma planta que ocorre espontaneamente ao redor de habitações e áreas perturbadas.

As denominações comuns no Brasil são camapú, camapúm, joá-de-capote, saco-de-bode, bucho-de-rã, mata-fome, bate-testa, joá, balãozinho, balão-rajado, joá-de-balão, camaru e camambu (LORENZI, 2001; CORRÊA, 1984; KISSMANN,1995).

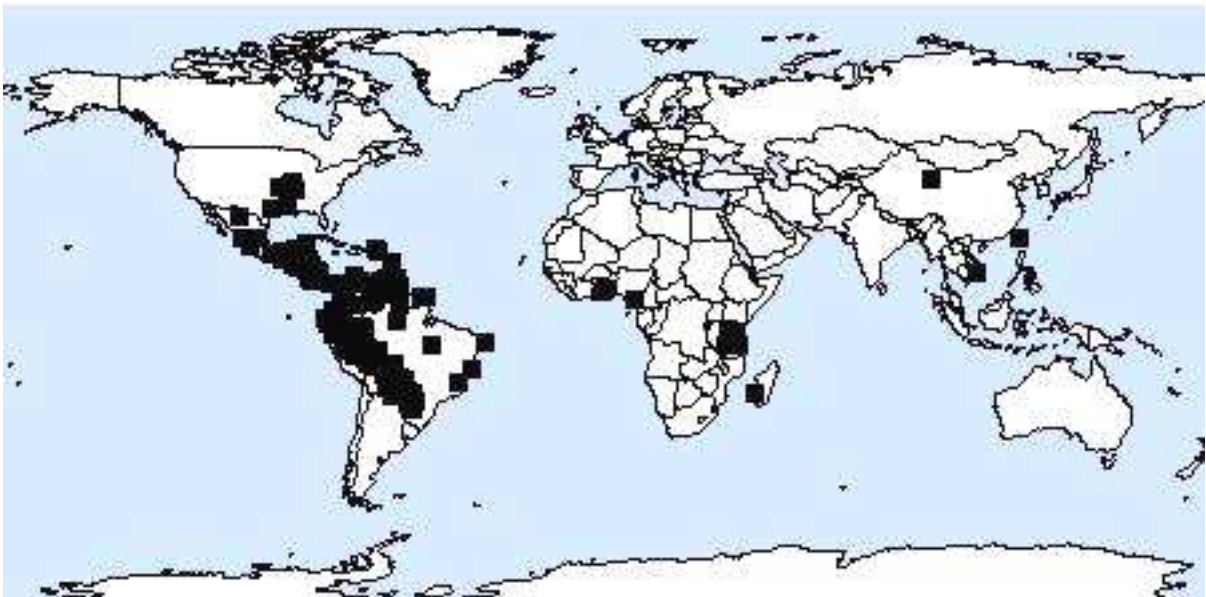


Figura 1 - Mapa de distribuição geográfica do camapú (*Physalis angulata* L.)

FONTE: <http://mobot1.mobot.org/website/mappost.asp>

2.1.2 Aspectos botânicos

O camapú (*Pysalis angulata* L.) pertence à família Solanaceae é uma erva, anual, ruderal, com altura variando de 30 a 60 cm. As folhas são alternas, pubescentes, membranáceas, elíptico-ovolada, pecíolo canaliculado variando de 2 a 4 cm de comprimento; lâmina variando de tamanho de 2 a 7 cm de comprimento por 1 a 3,5 cm de largura, bordos lisos nas folhas e alguns dentes com tendência a se transformarem em lóbulos nas folhas adultas, pedicelo cilíndrico e piloso (CAVALCANTE, 1996).

As flores são solitárias, axilares com cálice rotáceo-campanulado, contendo 5 sépalas soldadas até a metade, formando um tubo com 2,0 a 3,0 mm de comprimento; os lobos são deltóides a lanceolados, sendo cuspidados no ápice, arredondados na base e ampliados no fruto; a corola é rotáceo-campanulada com coloração amarelo-pálida sendo que $\frac{1}{4}$ basal do interior do tubo marrom; contém 5 estames com anteras elípticas, azuis, dorsifixas e filetes cilíndricos; o ovário é subgloboso com diâmetro variando de 1,2 a 1,5 mm, bilocular e pluriovular; com estilete filiforme e estigma capitado; e o disco hipógino possui 2,5 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura (NURIT SILVA, 2005). A polinização é autógama com floração durando em média três dias (ROSSAL, 2007).

O fruto é uma baga globosa, elipsóide, indescente, apresenta a coloração amarelada quando maduro, com comprimento médio de 1,34 cm (variando de 1,11 a 1,68 cm), largura média de 1,34 cm (variando de 1,13 a 1,66 cm), pedúnculo de consistência herbácea e cálice inflado acrescentado e persistente (SILVA, 2006).

As sementes são numerosas, variando entre 0,8 a 1,0 mm de diâmetro, discóides com testa reticulada e com coloração ferrugíneo a marrom com germinação acima de 64% (NURIT SILVA, 2005).



Figura 2 - Camapú (*Physalis angulata*). A - Planta, B - Flor, C - Fruto imaturo, D - Fruto maduro
 FONTE: www.missouriplants.com

2.1.3 Potencialidade econômica

A produção de pequenas frutas tem despertado a atenção de consumidores, processadores de frutas, agentes comercializadores e, por consequência, produtores em escala familiar e de médio e grande porte (PAGOT e HOFFMANN, 2003).

O termo pequenas frutas vem sendo utilizado para um grupo de espécies que exigem muita mão-de-obra, trabalhos intensos e alto retorno econômico em áreas pequenas de cultivo em um curto espaço de tempo (PAGOT e HOFFMANN, 2003).

O camapú é uma espécie de grande valor nutricional e econômico que pode ser estudada para a incorporação no quadro das pequenas frutas. Esta planta frutífera caracteriza-se por produzir frutos ligeiramente acidulados (CAVALCANTE, 1996) e com bom conteúdo de vitamina A, C, ferro e fósforo (COSTA, 2007).

Segundo Cavalcante (1996), os frutos do camapú podem ser consumidos na forma *in natura* ou em conserva com vinagre, tipo “picles”, além de serem usados na preparação de doces, geléias, sorvetes, bombons e em molhos de saladas e carnes (COSTA, 2007).

Apesar de o camapú ser popular na região Norte e Nordeste, ainda é pouco conhecido no Sul e Sudeste, sendo encontrado em alguns supermercados com preços bastante

elevados em decorrência da grande parte da produção ser importada da Colômbia (SBRT, 2007).

Além do valor alimentício, o camapú também é largamente empregado na medicina popular de todo o mundo, principalmente da América do Sul, como o Peru (DUKE, 1994), Colômbia (SILVA, 2005), Suriname (HASRAT, 1997) e Brasil (AGRA, 1994).

Na medicina popular brasileira o camapú é usado no tratamento de várias enfermidades: os frutos, folhas e raízes no combate a diabetes, reumatismo, doenças da pele, bexiga, rins e fígado, malária, anti-inflamatório, sedativo e anti-vômito (COSTA, 2007; PIETRO, 2001; MATOS, 2000).

No início dos anos 70, foram identificadas as moléculas extraídas do camapú, e foram chamadas de fisalinas em referência ao nome científico da planta (SOARES, 2003). Estudos realizados posteriormente com o camapú revelaram que os extratos e frações de toda a planta apresentam atividades antineoplásicas (ARAÚJO, 2007; RIBEIRO, 2002), antitumoral (CHAIING, 1992), e o extrato etanólico dos frutos apresenta ação antibacteriana (LOPES, 2006).

Conforme Pietro (2001), o extrato bruto do camapú inibe a multiplicação de micobactérias (gênero *Mycobacterium*) causadoras da tuberculose e de doenças oportunistas em pacientes com defesas orgânicas enfraquecidas.

2.2 Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e de maior impacto (GRATTAPAGLIA, 1998). Segundo Barrueto Cid (2001), a micropropagação consiste na propagação de plantas em laboratório, sob adequadas condições de assepsia e fatores nutricionais e ambientais adequados.

Conforme Grattapaglia (1998), a micropropagação de plantas *in vitro* ocorre a partir de cultura de meristemas, gemas apicais, gemas axilares, folhas e segmentos nodais (via organogênese direta), calo (via organogênese indireta), e embriões (via embriogênese).

A micropropagação difere da propagação tradicional nos componentes biológicos de cada etapa, pois são separados dentro de estágios (estabelecimento dos explantes *in vitro*, multiplicação, alongamento e enraizamento), aumentando assim o controle de cada aspecto da regeneração e dos processos de desenvolvimento. As etapas podem ser manipuladas pela seleção de explantes e controle do desenvolvimento da cultura (HARTMANN, 2002).

Através da micropropagação, obtêm-se clones com as mesmas características genéticas da planta matriz, a qual permite a preservação de genótipos (FRANÇA, 2003). Além da obtenção de plantas com alta qualidade fitossanitária, facilidade no manuseio e transporte, independência da sazonalidade e utilização de pequenas porções da planta para produção em larga escala comercial (GEORGE, 1993).

2.2.1 Organogênese

A organogênese refere-se à formação de estruturas monopolares como raízes, brotos e flores a partir de explantes ou calos cultivados *in vitro* (LITZ, 1992), mediante a diferenciação e rediferenciação celular, dependendo da retomada da atividade meristemática em células maduras diferenciadas (ZIV, 1999).

O processo de organogênese *in vitro* é considerado complexo, com a atuação de múltiplos fatores externos e internos envolvendo uma interação entre a fonte de explante, o meio de cultura e fatores ambientais (GEORGE, 1993; PIERIK, 1997). Depende também da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (SUGIYAMA, 1999).

Duas fases principais estão envolvidas na rota morfogênica *in vitro*: a fase de indução e a fase de expressão, ou seja, indução das células em adquirir competência organogênica e a expressão desse potencial no desenvolvimento de órgãos (ZIV, 1999).

A organogênese é dita direta quando as regenerações dos órgãos se formam diretamente dos explantes, tais como, meristemas, gemas axilares, segmentos nodais de folhas e segmentos nodais (HAMMERSCHLAG, 1992). Estes explantes são isolados, desinfetados e inoculados em meio de cultura contendo reguladores de crescimento, que proporcionam a quebra da dominância apical e a multiplicação de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA, 1998).

Quando o processo de regeneração de gemas adventícias é precedido pela formação de calos, e conhecida por organogênese indireta, esta ocorre das células não organizadas do calo surgem gemas adventícias que crescem e desenvolvem partes aéreas. A multiplicação sucessiva pode dar-se pela subdivisão de calos e manutenção de um sistema adventício, ou pela alteração do processo de proliferação axilar (GRATTAPAGLIA, 1998).

2.2.2 Meio de cultura

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em parte, o padrão do desenvolvimento. Segundo Caldas (1998), as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas *in vitro*, embora, em alguns processos, como a fotossíntese, possam ser reduzidos pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células.

Dessa forma, os meios nutritivos baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações, para atender às necessidades de cada espécie no cultivo *in vitro*, assim, para cada situação (tipo de explante, espécie, cultivar e objetivo), o meio adequado e eficiente é variável (PASQUAL, 2001).

Para suprir as necessidades de tecidos e órgãos cultivados *in vitro*, o meio de cultura deverá conter em sua composição *água e nutrientes* necessários ao crescimento, *carboidratos* para substituir o carbono que a planta fixa na atmosfera pela fotossíntese, componentes orgânicos como *vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento* para proporcionar melhor desenvolvimento (PASQUAL, 1997).

A sacarose, juntamente com o nitrogênio, é o principal componente em quantidade no meio de cultura, contribuindo de forma efetiva tanto no metabolismo celular como na regulação do seu potencial osmótico (NAGAO,1994).

A sacarose é o carboidrato comumente utilizado nas características essenciais como alta solubilidade, rápida metabolização e por ser o açúcar mais transportado e armazenado pela maioria das células vegetais (PASQUAL, 1997). Segundo Torres (1990), os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento das células, além de atuarem como um componente osmótico do meio de cultura.

Para Grattapaglia (1998), a concentração de sacarose é um fator importante para obter crescimento satisfatório, pois afeta a assimilação de nutrientes e o efeito de reguladores de crescimento. Além disso, a concentração de sacarose afeta a produção de metabólicos secundários, de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular.

O nitrogênio é essencial por fazer parte de inúmeras estruturas orgânicas, compondo os nucleotídeos, que formam os ácidos nucléicos (DNA e RNA), como também aminoácidos, que constituem as proteínas, estando presentes na própria molécula de clorofila.

A deficiência de nitrogênio nas plantas causa amarelecimento geral das folhas ou clorose, iniciando-se pelas folhas mais velhas, do ápice para a base. Uma vez que sem nitrogênio não há proteína, as plantas deficientes desenvolvem-se menos do que as bem

supridas com esse elemento. Por outro lado, um excesso de nitrogênio no meio faz com que haja um crescimento excessivo da parte vegetativa e armazene menos carboidrato (LIMA FILHO, 1997).

A fonte de nitrogênio também exerce influência sobre o crescimento e a produção de metabólitos das culturas *in vitro* (RUSSOWKI, 2003). Donato (1999) relata que quando o nitrogênio é fornecido somente na forma de sais inorgânicos de amônio, as células *in vitro* apresentam sintomas de toxidez, e quando ocorre a combinação das duas formas de nitrogênio, nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), estimula o crescimento de muitas espécies *in vitro*.

2.2.3 Reguladores de crescimento

Os hormônios vegetais ou fitohormônios são substâncias orgânicas produzidas pela própria planta que, em concentrações baixas, promovem, inibem ou modificam qualitativamente o crescimento vegetal, geralmente em um tecido diferente daquele onde foi produzido (RAVEN, 2001).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que, quando aplicadas nas plantas, apresentam propriedades químicas semelhantes à dos hormônios (CALDAS, 1998). Na cultura *in vitro* os reguladores de crescimentos, especialmente as auxinas e citocininas são adicionados para suprir as deficiências dos teores endógenos do próprio explante, estimulando respostas de interesse para diferenciação, crescimento, alongamento e multiplicação celular (GRATTAPAGLIA, 1998).

As auxinas como ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolacético (AIA) são bastante usadas em micropropagação, sendo incorporadas ao meio de cultura para promover a formação e crescimento de calo e de suspensão de células ou órgãos, bem como regular a morfogênese (PÁSCOAL, 1997). Enquanto que as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e tiadizuron (TDZ) promovem a formação de

brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (CALDAS, 1998; TORRES, 1998).

O ácido indolacético (AIA) é uma auxina, muito utilizada, principalmente, para estimular o enraizamento de brotações de *Actinidia chinensis* (SCALIZE, 2001), *Pothomorphe peltata* (SCHWERTNER, 2008), *Phoenix dactylifera* (COSTA, 2006).

Entre as inúmeras citocininas disponíveis, a BAP é provavelmente uma das mais utilizadas para a propagação *in vitro* de plantas medicinais, devido a sua alta eficiência na proliferação de brotações (ECHEVERRIGARAY, 2001). De acordo com Caldas (1998), o BAP é a citocinina mais eficaz para promover a indução e multiplicação de partes aéreas da maioria das espécies. Recentemente, a BAP foi utilizada para a micropropagação de *Palonia* (BERUTO, 2004), *Hibiscus* (HERARTH, 2004), *Orthosiphon* sp. (ELANGOMATHAVAN, 2003), *Rubus* (MARTINUSEEN, 2004) e *Curcuma zedoaria* (LOE, 2005).

O modo de interação entre auxina e citocininas é frequentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura. A maneira complexa, que os reguladores de crescimento e as células interagem, indica que se o tecido não está em um estágio responsivo, este não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores são utilizados (BONGA, 1992).

2.3 Aclimatização

A aclimatização é a fase da micropropagação em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro* para o ambiente externo, à casa-de-vegetação e, posteriormente, para o campo (SILVA, 2003). É uma fase crucial, pois propicia a viabilização efetiva das mudas que serão utilizadas nos elos subseqüentes da cadeia produtiva da cultura (HOFFMANN, 2002). Grattapaglia (1998) considera que existam vários fatores que

interferem no processo de aclimatização, sendo os principais abióticos: luminosidade, nutrientes e umidade relativa.

Conforme Cozai (1995), as condições *in vitro* como umidade relativa, temperatura do ar, alta concentração de CO₂, íons e reguladores de crescimento são alterados quando essas plantas são submetidas à condições de aclimatização, dificultando o seu crescimento, ocorrendo redução na absorção de água e íons pelo sistema radicular.

Os explantes vegetais mantidos *in vitro* absorvem carboidratos e compostos nitrogenados inorgânicos do meio de cultura em que se desenvolve, através da própria raiz ou por difusão nas células em contato com o meio, permitindo obter energia, esqueletos de carbono, nitrogênio e outros íons para o seu desenvolvimento.

Na aclimatização, o explante é retirado das condições assépticas e conta somente com os compostos orgânicos acumulados nas partes aérea e radicular, sendo necessário desenvolver novas folhas com o processo fotossintético e estômatos funcionais, novas raízes para fixação e absorção (HAZARICA, 2003).

Para Hoffmann (2002), a transferência de plantas, das condições assépticas e heterotróficas, para o crescimento em ambiente externo deve ser realizada cuidadosamente e de forma gradativa, a fim de evitar a morte de um número significativo de mudas.

As novas condições devem ser passadas às plantas progressivamente, de forma que elas não sofram estresses que possam culminar em danos profundos ou mesmo na sua morte (SILVA, 1995).

2.3.1 Substrato

O substrato desempenha importante papel na sobrevivência e desenvolvimento inicial da nova planta, além de influência no processo de enraizamento adventício e sobre a qualidade das raízes formadas. A seleção do substrato é de fundamental importância no

crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas, podendo influenciar diretamente no sucesso da aclimatização (COUTO, 2003).

Segundo Calvete (1998), o substrato deve ser de baixa densidade, rico em nutrientes, composições químicas equilibradas e físicas uniformes, boa aeração e drenagem, boa coesão entre as partículas e raízes, e estar, preferencialmente, isento de plantas daninhas e flora bacteriana.

Outro aspecto a ser considerado é o grau de dificuldade na obtenção, formulação e no custo do substrato, normalmente, os substratos comercializados apresentam características físico-químicas adequadas à formação inicial de diversas espécies, porém o alto custo pode inviabilizar a produção. Por isso, há a necessidade de se adaptar um substrato composto por materiais facilmente obtidos, com características químicas, físicas, biológicas e econômicas desejáveis (DANNER, 2007).

Dentre os substratos utilizados para a aclimatização estão a vermiculita, plantimax® e o terriço de mata². A vermiculita em virtude de apresenta alta retenção de água, elevada porosidade e baixa densidade (STUMPF, 2001). O plantimax® apresenta vantagem pela sua uniformidade de composição química e física, diferentemente do que pode ocorrer com a vermiculita e o terriço de mata, os quais podem variar nas suas características (HOFFMANN, 2001). O terriço de mata tem sido utilizado por ser rico em nutrientes (orgânicos e minerais), com elevada retenção de água e lenta mineralização.

Embora o substrato possa ser formado por um único material, dificilmente será encontrado um que suprirá todas as características positivas necessárias. Por essa razão, os substratos em geral representam a mistura de dois ou mais materiais, sendo que um destes, o

² Terriço de mata - é o material orgânico curtido constituído de restos vegetais e microorganismos apodrecidos retirados da mata.

condicionador de substratos, irá promover a correção das características de forma a otimizar as condições de uso (KÄMPF, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Para a multiplicação de camapú (*Physalis angula*), foram utilizados explantes de plantas estabelecidas *in vitro*, provenientes de sementes coletadas de plantas localizadas na Estação experimental do Ariaú do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no município de Iranduba (3°09'10"S / 59°15'3" W).

3.1 Micropropagação de camapú

3.1.1 Preparo dos Explantes

Segmentos nodais foram retirados de plantas de camapú crescidas *in vitro* com 30 dias de idade. Os segmentos nodais foram seccionados na base e no ápice em corte reto, contendo duas gemas axilares opostas e com comprimento variando de 1 a 1,5 cm.

3.1.2 Preparo dos Meios de Cultura

O meio básico de cultura utilizado no estudo foi o MS contendo sais minerais, vitaminas e compostos orgânicos. O pH foi ajustado em 5,7 antes da esterilização, a qual foi realizada por autoclavagem por 20 minutos à temperatura de 120°C. Os reguladores de crescimento foram adicionados aos meios de cultura antes da autoclavagem.

3.1.3 Condições de Cultura

Todas as culturas *in vitro* foram realizadas em tubos de ensaios com capacidade de 60 ml (15ml de meio de cultura por tubo). Após a inoculação dos explantes em posição vertical sobre a superfície do meio, os tubos de ensaios foram vedados com filme plástico transparente. As culturas foram mantidas em sala de crescimento por 40 dias, na presença de

luz, a uma temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de aproximadamente $60 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 16 horas.

3.1.4 Experimentos de Proliferação de brotos

Experimento 1: Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e 3-ácido indolacético (AIA) para proliferação de brotos a partir de segmentos nodais de camapú.

O meio MS foi acrescido de 3% de sacarose e 0,7% de ágar e suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e 3-ácido indolacético (AIA) conforme tabela 1.

BAP (mg.L ⁻¹)	AIA (mg.L ⁻¹)			
	0	0,5	1,5	3,0
0	T1	T2	T3	T4
0,5	T5	T6	T7	T8
1,5	T9	T10	T11	T12
2,5	T13	T14	T15	T16
5,0	T17	T18	T19	T20

Tabela 1- Tratamentos com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e 3-ácido indolacético (AIA) adicionado ao meio Murashige & Skoog (1962) para diferenciação de gemas e proliferação de brotos em explantes de *Physalis angulata* L. UFAM, Manaus, 2007. T= tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial de 5x4, totalizando 20 tratamentos, com 15 repetições por tratamento. As características foram quanto ao comprimento médio da planta, número médio de folhas, número médio de brotos adventícios > 1 cm e presença de raiz.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e o efeito das interações das concentrações de sacarose e nitrogênio, por análise de regressão polinomial, através do programa computacional Sanest (ZONTA, 1987).

Experimento 2: Efeito da concentração de sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a proliferação de brotos adventícios a partir de segmentos nodais de camapú.

O meio MS foi acrescido 0,7% de ágar e modificados nas concentrações de nitrogênio inorgânico total (KNO_3 e NH_4NO_3) e sacarose conforme tabela 2.

Sacarose (g.L^{-1})	Nitrogênio inorgânico				
	0 MS	$\frac{1}{4}$ MS	$\frac{1}{2}$ MS	1MS	2 MS
0	T1	T2	T3	T4	T5
7,5	T6	T7	T8	T9	T10
15	T11	T12	T13	T14	T15
30	T16	T17	T18	T19	T20
45	T21	T22	T23	T24	T25

Tabela 2 - Tratamento com diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico e sacarose adicionado ao meio Murashige & Skoog (1962) para diferenciação de gemas e proliferação de brotos em explantes de camapú (*Physalis angulata* L.) UFAM, Manaus, 2007. T= tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial de 5x5, totalizando 25 tratamentos, com 20 repetições por tratamento. As características avaliadas foram: comprimento médio do broto, número médio de folhas, número médio de segmento, comprimento médio da raiz e número médio de botão floral. Os resultados foram submetidos à análise de variância e o efeito das interações das concentrações de sacarose e nitrogênio, por análise de regressão polinomial, através do programa computacional Sanest (ZONTA, 1987).

3.2 Substratos para aclimatização de plantas micropropagadas de camapú

O presente estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu-se da formação de plantas micropropagadas de camapú em meio de cultura MS sem a suplementação de fitoreguladores de crescimento. Na segunda etapa, realizada após 30 dias de

cultivo *in vitro*, os brotos adventícios foram retirados dos tubos de ensaio, e lavados em água corrente, com o objetivo de retirar o excesso do meio de cultura, e transferidos para os tubetes contendo substratos: vermiculita, plantimax®, terriço de mata, vermiculita + plantimax® (1:1 v/v), vermiculita + terriço de mata solo (1:1 v/v) e plantimax® + terriço de mata solo (1:1 v/v). O ambiente de aclimatização foi realizado em uma casa-de-vegetação com nebulização intermitente e sombreamento de 50%, obtido através de uma camada de tela sombrite.

As características avaliadas após 60 dias de aclimatização foram: porcentagem de sobrevivência, comprimento médio da planta, número médio de folhas, comprimento médio da raiz, número médio de botões florais, peso médio da matéria fresca planta.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, contendo 6 tratamentos com 15 repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$), através do programa computacional Sanest (ZONTA, 1987).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e 3-ácido indolacético (AIA) para multiplicação de brotos adventícios a partir de segmentos nodais de camapú.

Observou-se o desenvolvimento dos brotos adventícios, via organogênese direta, após uma semana da inoculação dos explantes em meio MS. Aos 40 dias de cultivo, os resultados da análise de variância (Tabela 3) apresentam diferenças significativas para a interação dos reguladores de crescimento BAP e AIA em todas as características avaliadas.

Fonte de variação	GL	QM					
		Comprimento médio do broto (cm)	Nº médio de broto \geq 1 cm	Nº médio de folhas	Nº médio de segmento	Presença de raiz	Nº médio de botão floral
BAP	(4)	4,69**	0,21 ^{ns}	26,63**	1,57*	0,04*	1,69**
AIA	(3)	8,04**	0,41*	0,20 ^{ns}	1,24*	2,14**	11,26**
BAP x AIA	(12)	2,83**	0,49**	10,97**	1,91**	0,04**	1,57**
Resíduo	280	0,51	0,14	2,30	0,43	0,01	1,18
C.V. (%)		42,35	32,04	52,09	41,39	14,89	43,71

Tabela 3 - Resumo da análise de variância do efeito de níveis de BAP e AIA na proliferação de brotos de camapú (*Physalis angulata* L.) UFAM, Manaus, 2007.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Os brotos adventícios de camapú, quando cultivados em meio MS isento de reguladores de crescimentos apresentaram um comprimento médio de 13,22 cm. Porém, quando o meio MS foi suplementado com BAP e AIA, observou-se uma significativa queda no comprimento médio dos brotos, oscilando entre 3,98 a 1,78 cm como pode ser verificado na figura 3.

Segundo Gratapaglia (1998) a tendência de diminuição do comprimento da brotação, após aplicação das concentrações de BAP pode estar ligada ao fato de que os reguladores de crescimento estimulam a maior produção de partes aéreas até uma determinada concentração,

o que pode variar de acordo com a espécie, e a partir desta, ocorre o efeito tóxico, que se caracteriza, entre outros, pela falta de alongamento das culturas.

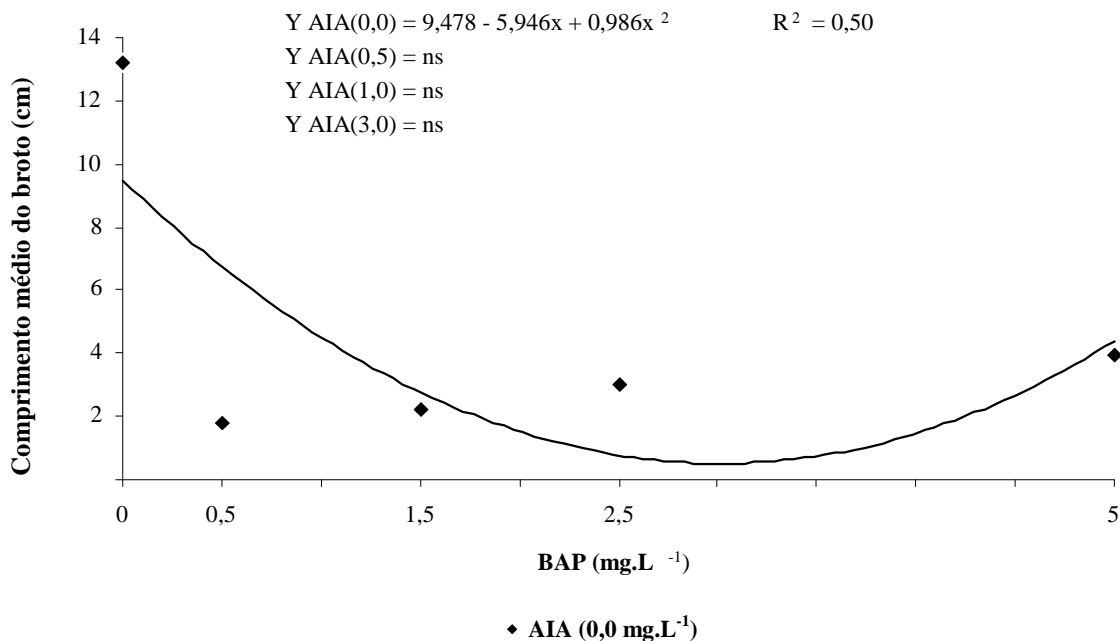


Figura 3- Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) no comprimento médio dos brotos de camapú (*Physalis angulata* L.).

Os tratamentos que resultaram em maior número médio de folhas normais foram os meios de cultura isento de BAP e AIA, e os que continham no meio de cultura apenas AIA na concentração de 0,5 mg.L⁻¹, alcançando em média 22,21 e 30,65 folhas por broto adventícios, respectivamente (Figura 4).

Com relação ao número de segmentos, verificou-se que o melhor resultado ocorreu no meio isento de reguladores de crescimento, apresentando em média 6,8 segmentos/broto adventícios. A adição das concentrações de BAP no meio de cultura proporcionou uma acentuada redução no número de segmentos. Observa-se ainda que a adição do AIA no meio de cultura não influenciou significativamente no número de segmentos/broto adventícios, pois proporcionou a mesma média obtida pela suplementação do BAP, a qual oscilou em torno de 2,56 a 1,15 segmentos/broto adventícios (Figura 5).

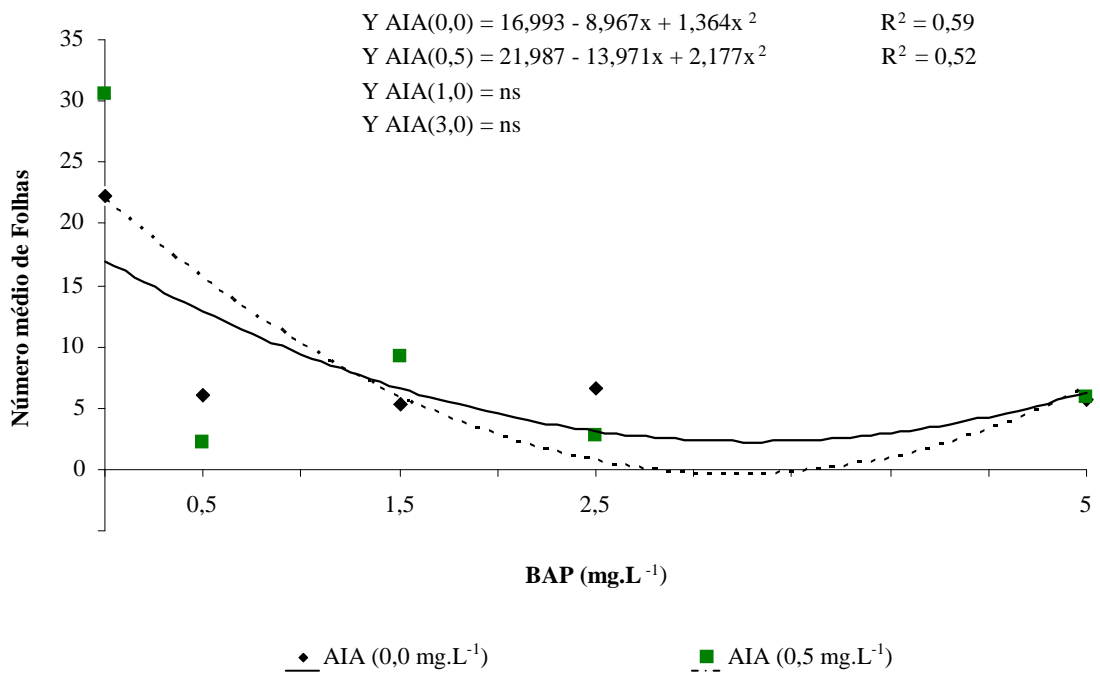


Figura 4 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) no número médio de folhas de camapú (*Physalis angulata* L.).

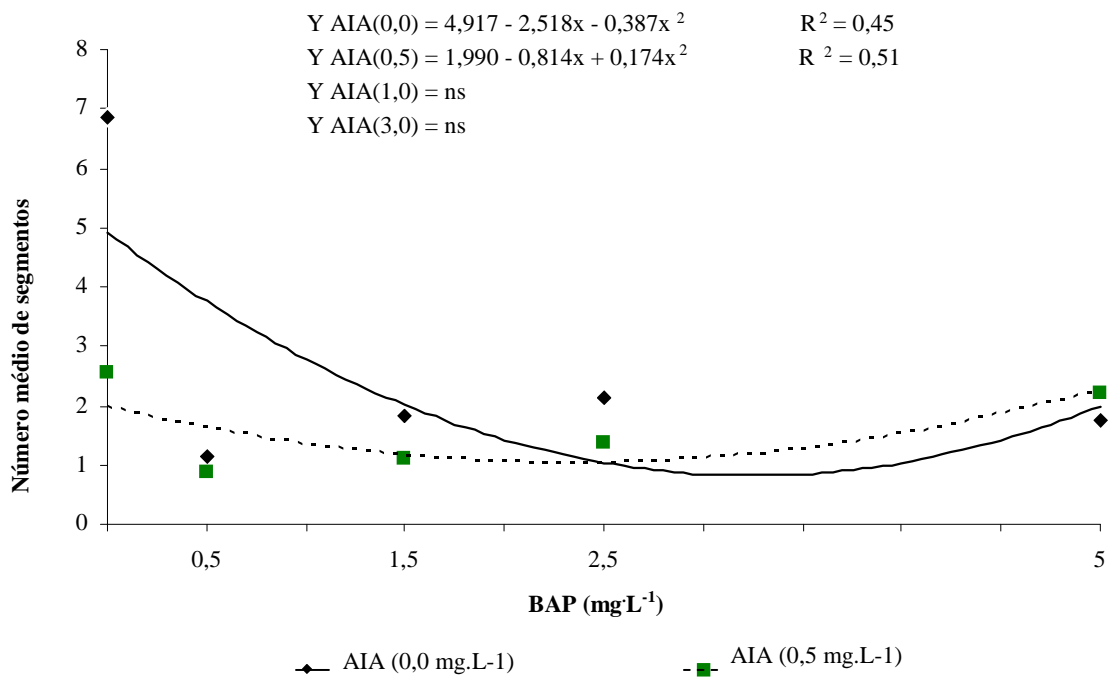


Figura 5 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) no número médio segmentos de camapú (*Physalis angulata* L.).

Segundo Lima (2008), as citocininas, em geral, promovem a produção de partes aéreas, mas seu excesso pode ser tóxico e levar ao encurtamento dos entrenós e a problemas na fase de enraizamento.

A inoculação do BAP no meio de cultura proporcionou uma grande multiplicação de brotações adventícias menores que 1 cm de comprimento, e por apresentarem-se deformadas, com caules curtos e retorcidos e folhas atípicas (Figura 6), ficou impossibilitada a realização da contagem do número total de brotos emitidos por explante. Cantagallo (2005), estudando o efeito de diferentes concentrações de BAP na indução de brotações de gemas axilares em citrumelo “Swingle”, observou que, à medida que se aumentava a concentração de BAP, houve tendência a redução das brotações.

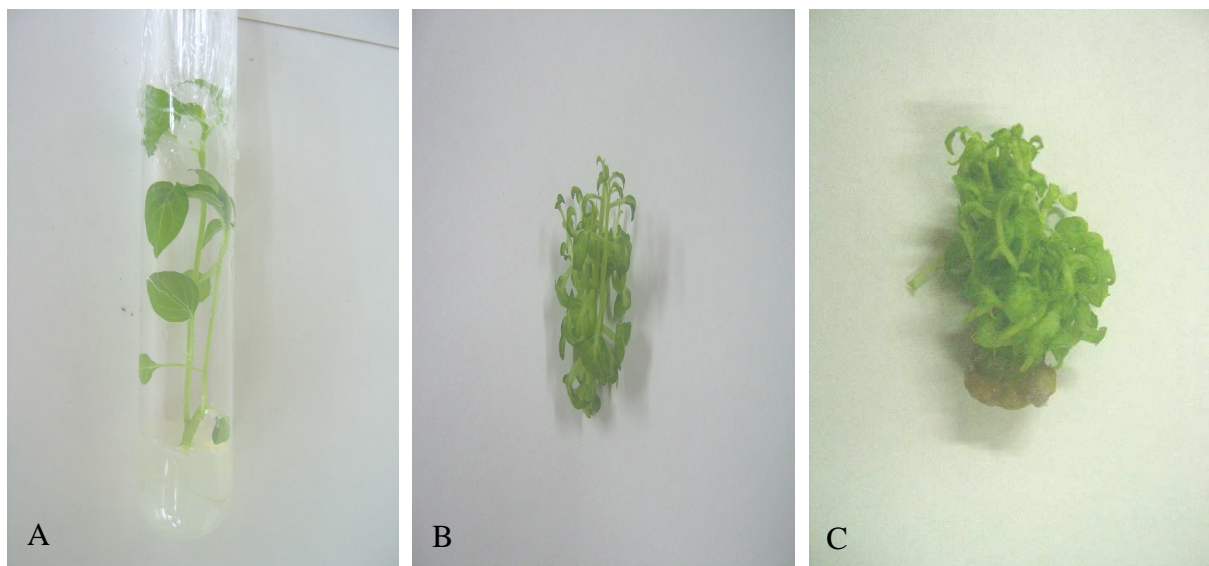


Figura 6 - Formação de brotos de camapú. A. meio MS ausente de reguladores de crescimento, B e C. meio MS com diferentes níveis de reguladores de crescimento (BAP e AIA).

Quanto ao número de brotos maiores ou iguais que 1 cm de comprimento, observou-se o desenvolvimento de apenas um broto adventício no tratamento com meio MS isento de BAP e AIA. Porém quando adicionou-se de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA combinadas ou não com todas as concentrações de BAP observou-se a ocorrência de 2 a 3 brotos adventícios (Figura 7).

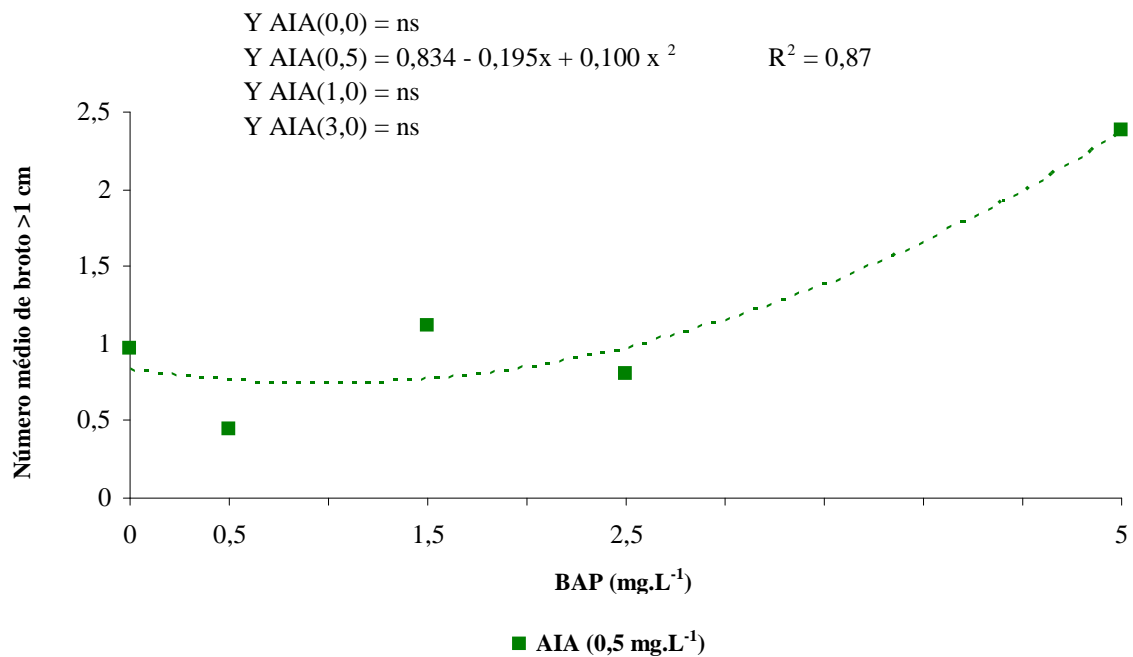


Figura 7 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) no número médio dos brotos > 1cm de comprimento de camapú (*Physalis angulata* L.).

A formação de raízes foi verificada nos brotos adventícios cultivados em meios de cultura isento de AIA e BAP, obtendo o percentual de 100% de enraizamento. E nos meios de cultura isento de AIA combinadas com as diferentes concentrações de BAP, conforme se observa na Figura 8.

Cuzzuol (1996) cita que diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraizam facilmente *in vitro* sob baixos níveis de auxina ou, simplesmente, em meio básico sem reguladores de crescimento.

Os resultados obtidos evidenciam que o enraizamento do camapú pode ser obtido sem a suplementação do meio básico com auxina. Este resultado pode representar uma grande vantagem econômica, pois reflete na imediata redução dos custos com a eliminação do uso de reguladores na fase de enraizamento *in vitro*.

O enraizamento sem o uso de reguladores é uma prática visada na automação da micropropagação, assim alguns trabalhos obtiveram o enraizamento de 45% em *Gypsophila paniculata* (LEE, 1977), 60% em *Salpiglossis sinuata* (KUSEY, 1980) e de 100% em *Hostea*

decorata, (HASEGAWA, 1980). Dois fatores podem ter contribuído para o enraizamento do camapú *in vitro*, sem o emprego de regulador: a produção endógena de auxina pela planta e o tamanho das partes aéreas. Brotos pequenos, em geral, não enraízam bem, necessitando, portanto, de uma fase intermediária adicional de alongamento. Segundo Coll (1988), as partes aéreas são fontes de intensa produção de auxina que, ao ser translocada para a base, estimularia a rizogênese.

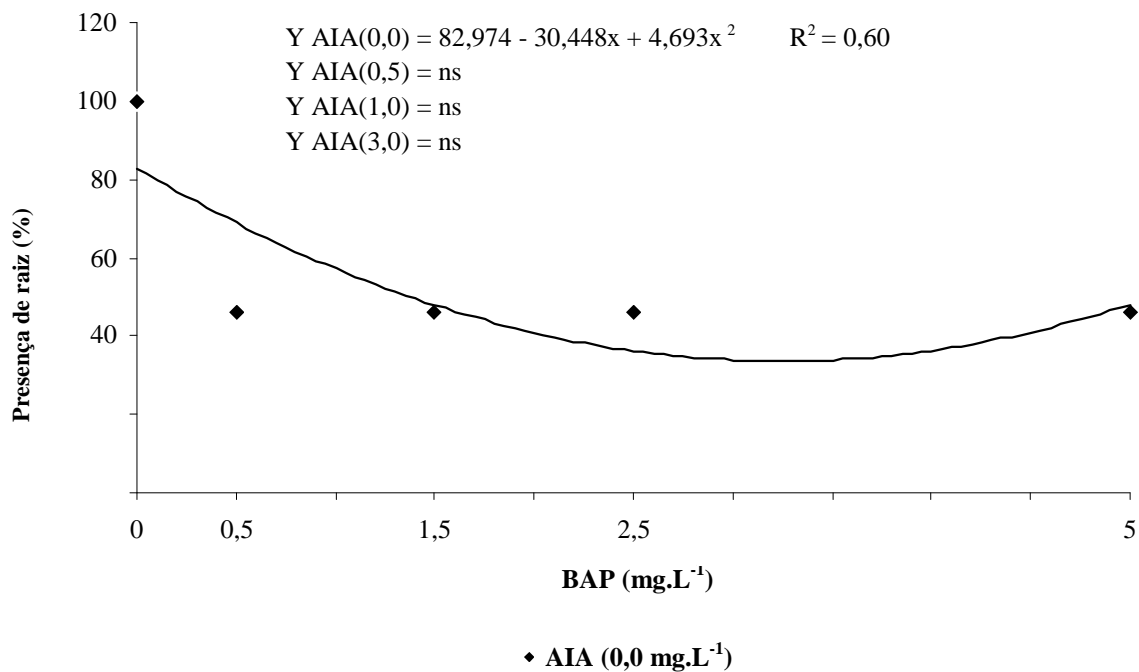


Figura 8 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento (BAP e AIA) na formação de raízes em brotos de camapú (*Physalis angulata* L.)

A formação de raízes adventícias *in vitro* permite a constituição de uma planta completa, o que posteriormente durante a fase de aclimatação, facilitará o pegamento da muda nas condições *ex vitro*.

Os botões florais foram observados a partir do 25º dia após a inoculação do explante ao meio MS, demonstrando comportamento diferenciado ao encontrado por Vasconcello (2003), que ao propagar *in vitro* segmentos nodais e apicais de camapú referentes ao 4º

subcultivo em meio MS, sem adição de reguladores de crescimento, obteve o florescimento após 3 meses de cultivo.

Os melhores resultados quanto à emissão de botões florais nas plântulas de camapú foram obtidos com segmentos nodais inoculados em meio MS isentos de BAP e AIA (Figura 9). Dos botões florais ocorrentes no tratamentos com meios isentos de reguladores de crescimento, apenas em 20% ocorreu à abertura das flores e 6% transformaram-se em frutos (Figura 10).

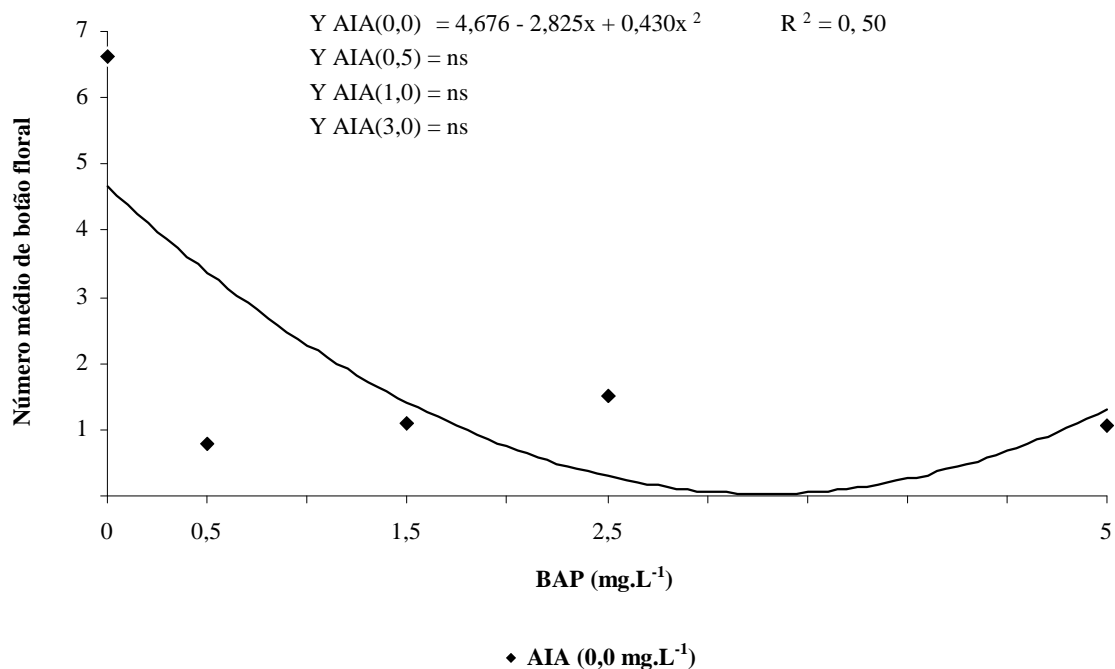


Figura 9 - Efeito das interações dos níveis dos reguladores de crescimento BAP e AIA no número médio de botões florais em brotos camapú (*Physalis angulata* L.)

Nos estudos realizados com camapú por Vasconcelos (2003), as flores apresentaram desenvolvimento normal e 60% do pólen das flores *in vitro* eram viáveis. Outros autores também apresentaram resultados mostrando que flores *in vitro* são capazes de produzir pólen viável (SARITHA, 2007; ZHANG, 2000).

Vasconcelos (2003) cita que muitos autores têm discutido sobre a influência dos reguladores de crescimento na indução de flores em cultivos *in vitro*, dentre estes a citocinina se destaca por exercer uma influência na florescência *in vitro*.

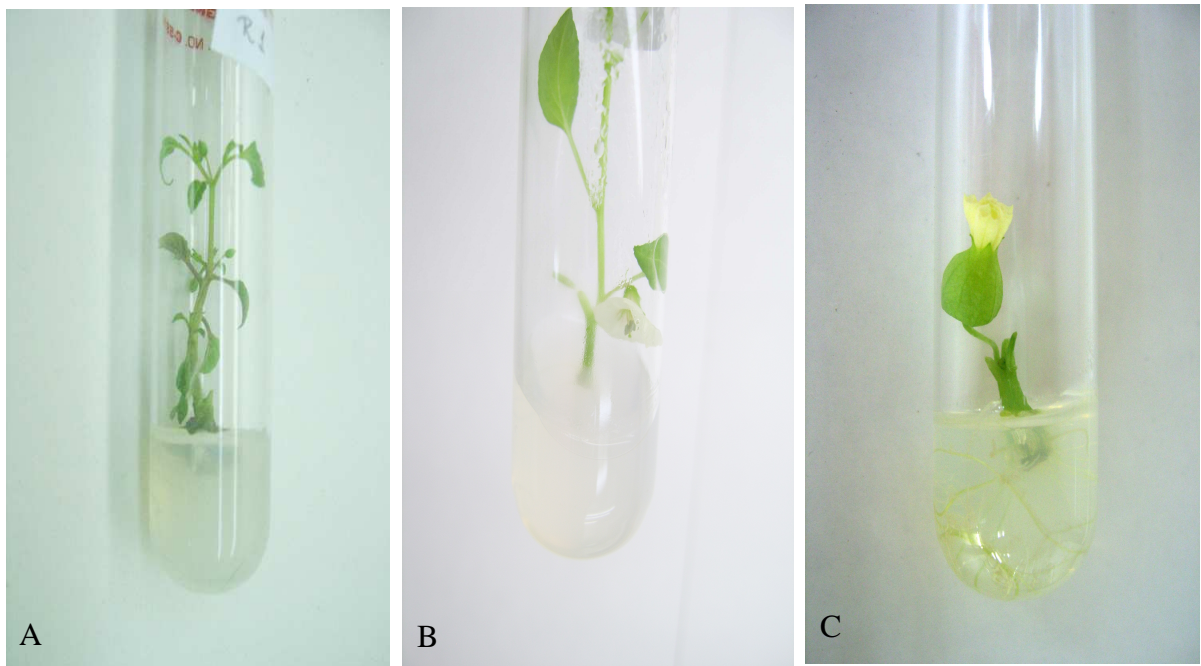


Figura 10 - Brotos adventícios em estágio produtivo de camapú *in vitro* A – emissão de botões florais, B - disposição de flor no broto, C - formação de frutos em broto.

A hipótese sugerida para a ocorrência de botões florais, flores e frutos *in vitro* das plantas de camapú, estão correlacionadas aos estresses ambientais, pois as condições externas afetam o desenvolvimento ou crescimento de órgãos isolados. Segundo Pitelli (2006), o estresse ativa várias respostas nas plantas, desde a alteração na expressão gênica e no metabolismo até mudanças na taxa de crescimento e produtividade. As principais causas do estresse podem estar correlacionadas a fatores como: a) o *número de subcultivo*, que favorece na ocorrência da maturidade, assim a planta usada como a fonte explante parece ser fundamental para o florescimento *in vitro* florescer (VASCONCELO, 2003); o *fotoperíodo e a intensidade de luz* são fatores determinantes de muitas respostas fisiológicas (CAVINS, 2001); c) a natureza da *fonte carbono* (mono ou dissacarídeos) e a *concentração de nitrogênio* no meio têm demonstrado influência na formação de botões reprodutivos (SIVANESAN, 2007).

A presença de antocianina foi identificada em toda a extensão dos brotos adventícios. E os que apresentaram antocianina, foram os cultivados em meio MS contendo as

concentrações de 1,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de BAP e na ausência de AIA (Figura 11). A formação *in vitro* de antocianina tem ocorrido em culturas cujas espécies naturalmente apresentam ou não cianidinas. Alves (2001) relata a ocorrência de antocianina em calos de *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* antes do aparecimento dos primórdios de gemas, e em *Fagus sylvatica* e *Fagus orientalis* nos locais de diferenciação de gemas.

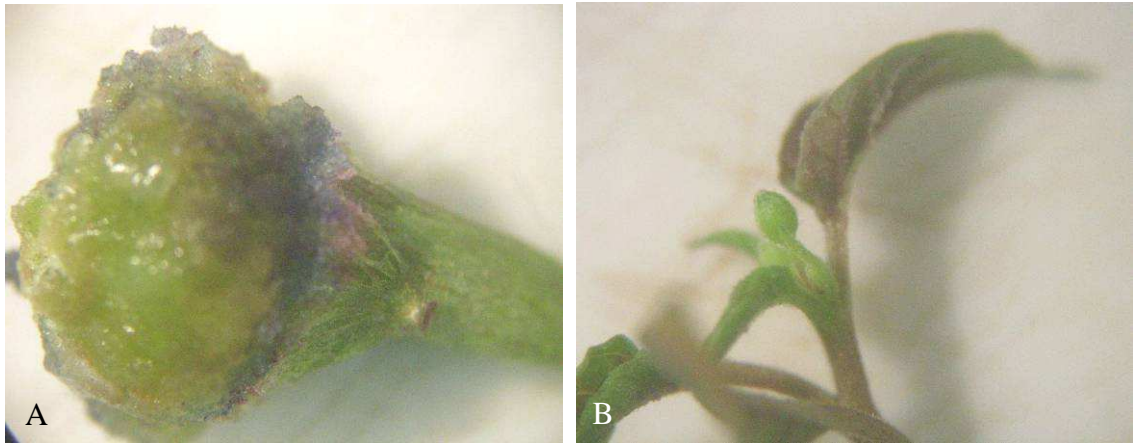


Figura 11 - Antocianina em plântulas de camapú. A - detalhe da base da plântula, B - detalhe da parte aérea da plântula.

4.2 Efeito da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação de brotos a partir de segmentos nodais de camapú.

Os resultados obtidos mostraram que todas as características estudadas foram afetadas significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, nas diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico e pela interação entre nitrogênio e sacarose (Tabela 4).

Fonte de variação	GL	QM				
		Comprimento médio do broto (cm)	Número médio de folhas	Número médio de segmento	Comprimento médio da raiz	Número médio de botão floral
Sacarose (S)	4	75,97**	13,40**	18,32**	24,34**	17,52**
Nitrogênio (N)	4	42,42**	12,42**	8,57**	6,89**	4,15**
S x N	16	3,65**	1,40**	1,98**	3,18**	1,11**
Resíduo	475	015	2,98	0,08	0,18	0,13
C.V. (%)		15,50	13,24	18,46	26,3	28,36

Tabela 4 - Resumo da análise de variância do efeito de níveis de Sacarose e Nitrogênio na proliferação de brotos de camapú (*Physalis angulata* L.) UFAM, Manaus, 2008.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Os brotos adventícios apresentaram maior comprimento médio no meio de cultura, contendo as concentrações de 15 e 30 g.L⁻¹ de sacarose combinados com a concentração MS e ½MS, com as médias de 14,00 e 13,35 cm de comprimento respectivamente, sem diferenças estatísticas significativas entre as duas concentrações de sacarose.

Os tratamentos contendo as concentrações de 7,5 e 45 g/L de sacarose, quando também combinadas com as diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico, não diferiram estatisticamente entre si, porém alçaram os melhores resultados na concentração normal e 50 % de nitrogênio inorgânico (Figura 12).

Os resultados também evidenciaram que, apesar de haver o desenvolvimento de broto, nas condições de ausência de nitrogênio, o comprimento dos brotos permaneceu limitado, independentemente da concentração de sacarose.

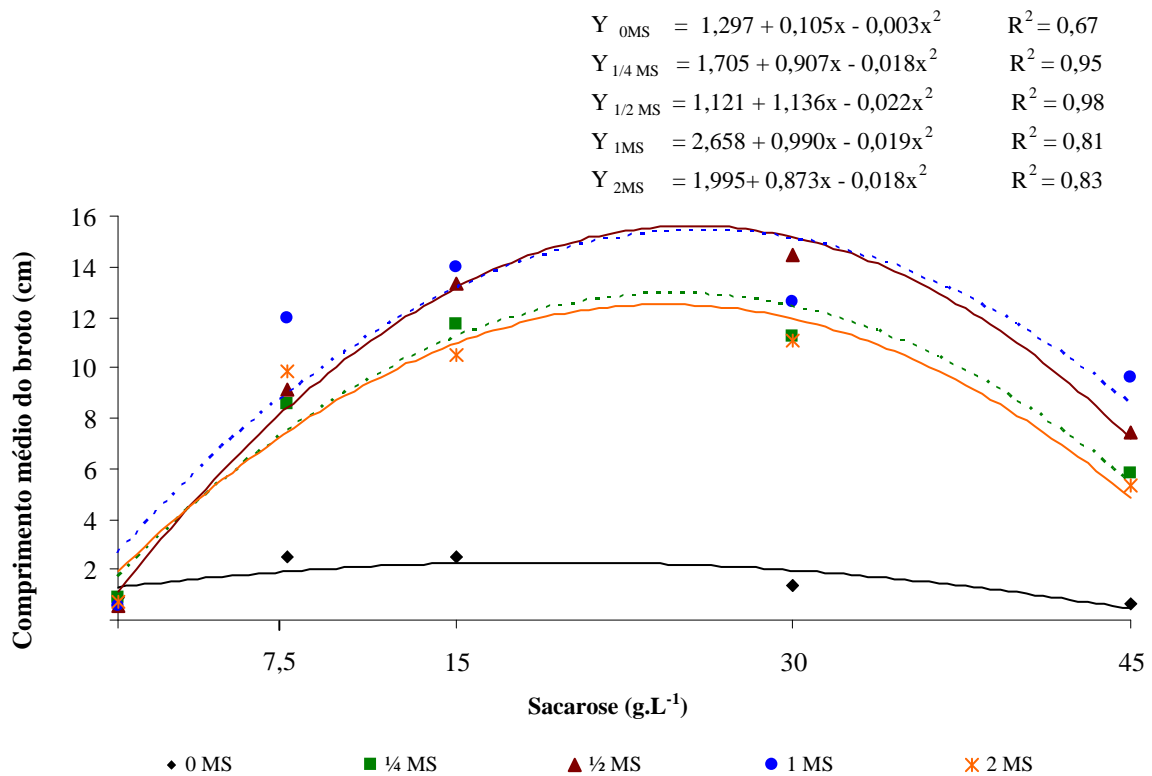


Figura 12 - Comprimento médio de brotos emitidos por explantes de camapú (*Physalis angulata* L.), aos 40 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio

A ausência de nitrogênio inorgânico nos meios de cultura proporcionou um decréscimo linear no número de segmentos nodais de camapú, com o aumento das concentrações de sacarose.

Com o incremento de diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico no meio de cultura, verificou-se um aumento significativo no número de segmentos nodais por broto adventícios, atingindo seus valores máximos de 4,69 e 4,67 segmentos por plântula, no intervalo de ¼ MS a ½ MS. A partir destas concentrações, começou a ocorrer um decréscimo no número de segmentos (Figura 13). O número de folhas também teve comportamento semelhante ao do número de segmentos nodais, pois na ausência de nitrogênio houve decréscimo no número de folhas à medida que se aumentava a concentração de sacarose. E, com a adição do nitrogênio no meio de cultura, os brotos adventícios emitiram mais folhas, atingindo a média de 12,09 folhas por broto adventício na combinação 45 g/L de sacarose na concentração 1MS (Figura 14).

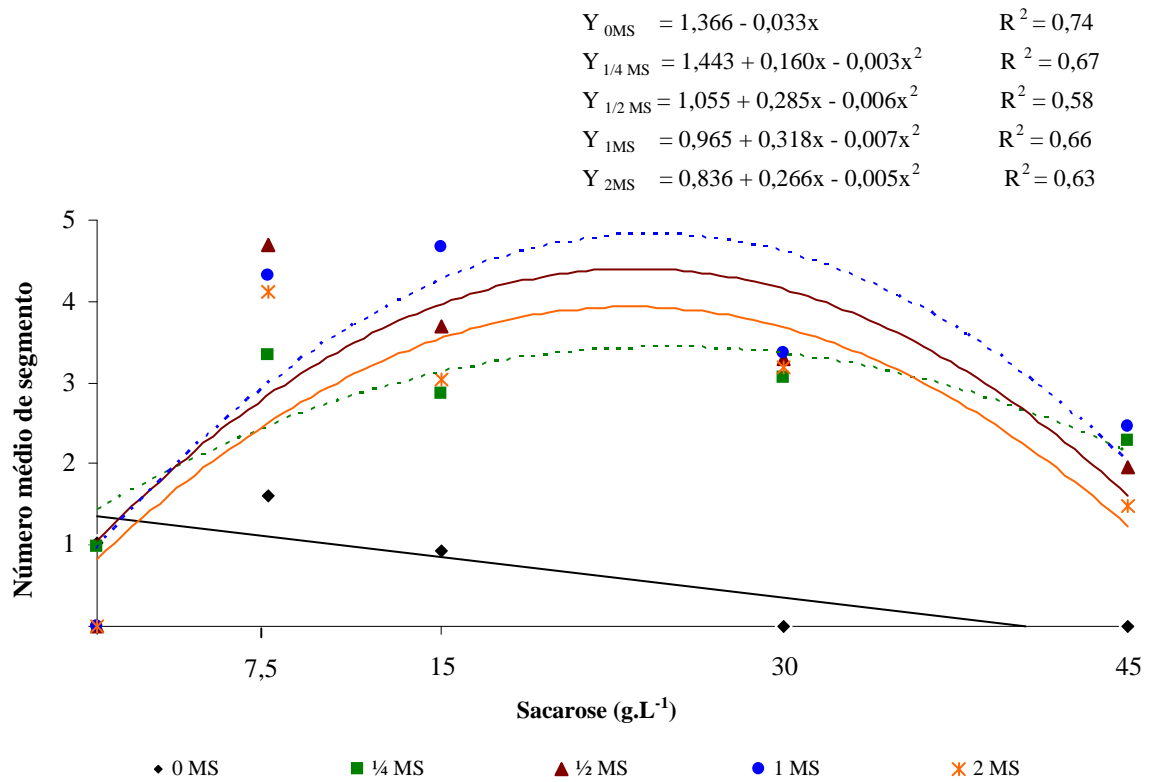


Figura 13 - Número médio de segmento nodais emitidos por explantes de camapú (*Physalis angulata* L.), aos 40 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio.

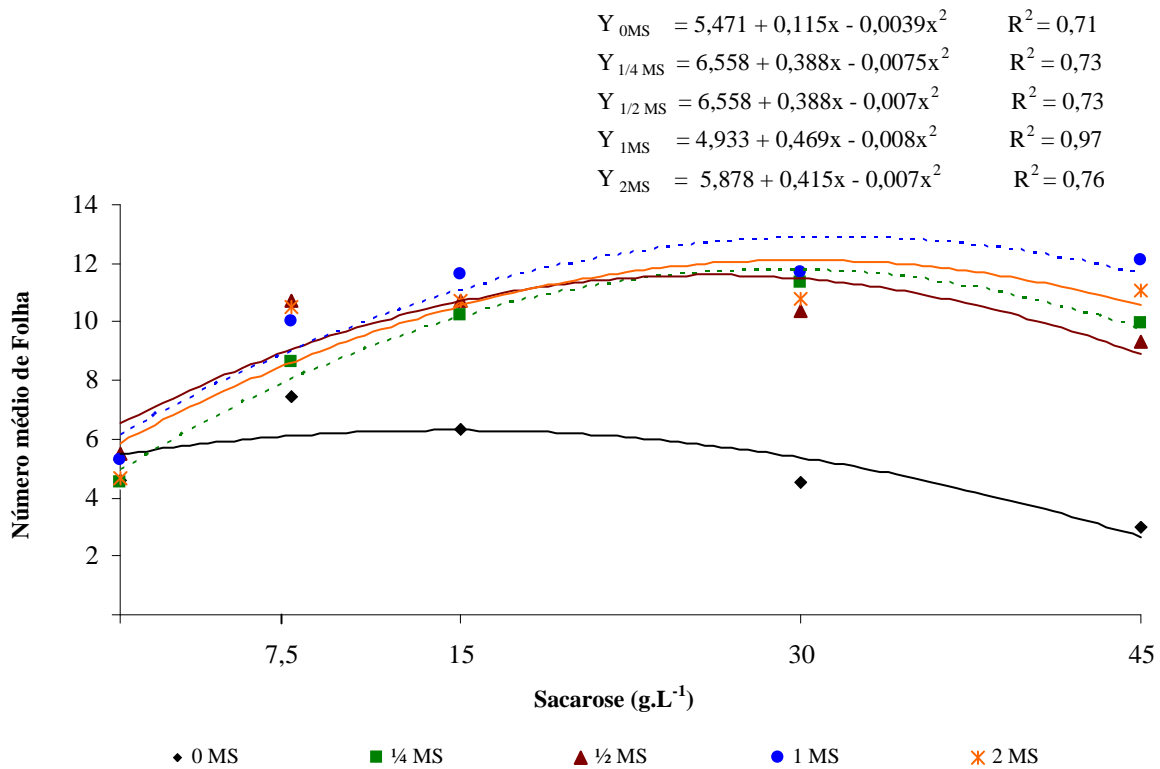


Figura 14 - Número médio de folha emitidos por explantes de camapú (*Physalis angulata* L.), aos 40 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio

Na ausência de nitrogênio inorgânico, as folhas dos brotos adventícios de camapú apresentaram-se aclorofiladas. Portanto, para o camapú, há necessidade de adição de nitrogênio no meio de cultura para o seu desenvolvimento.

O nitrogênio é um constituinte de aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas, portanto existe alguma relação entre o teor de nitrogênio e o crescimento das plantas, considerando que um dos principais sintomas da deficiência do nitrogênio é o amarelecimento ou clorose das folhas, devido à inibição da síntese de clorofila, resultante principalmente, da diminuição da fotossíntese e conseqüentemente, na síntese de aminoácidos essenciais (DONATO, 1999).

Com relação ao número médio de botões florais, os tratamentos, contendo nitrogênio no meio de cultura, mostraram-se superiores aos isentos de nitrogênio. O tratamento com 45 mg.L⁻¹ de sacarose, quando combinados com todas as concentrações de nitrogênio, obteve as melhores médias em número de segmento por broto adventícios, conforme se observa na figura 15.

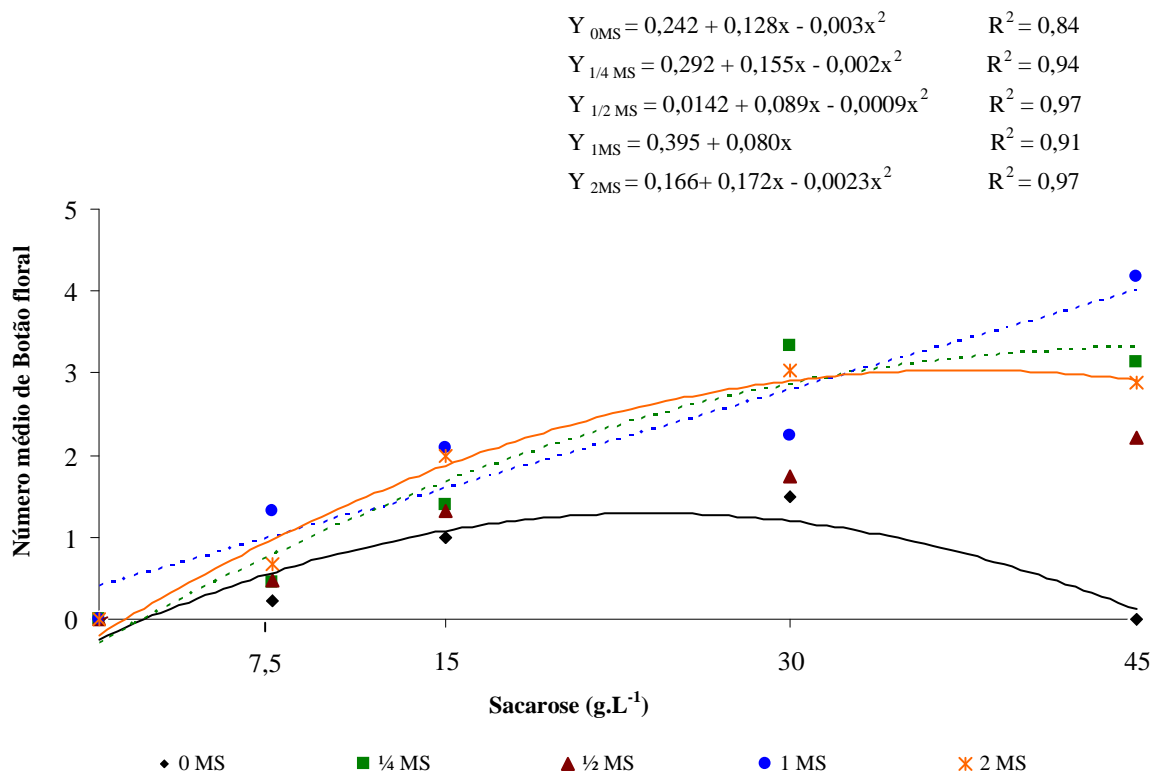


Figura 15 - Número médio de botões florais emitidos por explantes de camapú (*Physalis angulata* L.), aos 40 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio

A presença de antocianina na parte aérea dos brotos adventícios não demonstrou efeito sobre a produção de botões florais de camapú, conforme se observa na figura 16. Os brotos adventícios que apresentaram antocianina foram os que tiveram tratamentos, cultivados em meio de cultura, contendo 45 g.L^{-1} de sacarose, combinados com as diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico.

Com relação ao número de flores, os tratamentos com 45 g.L^{-1} de sacarose e 2MS, emitiram em torno de 1 a 3 flores por broto adventício, com o percentual de 57,14 % de brotos com flores. Os demais tratamentos apresentaram apenas uma flor por plântulas com o percentual de 14,29% para o tratamento contendo (45 g.L^{-1} de sacarose e 1MS), e 7,14% para os demais tratamentos.

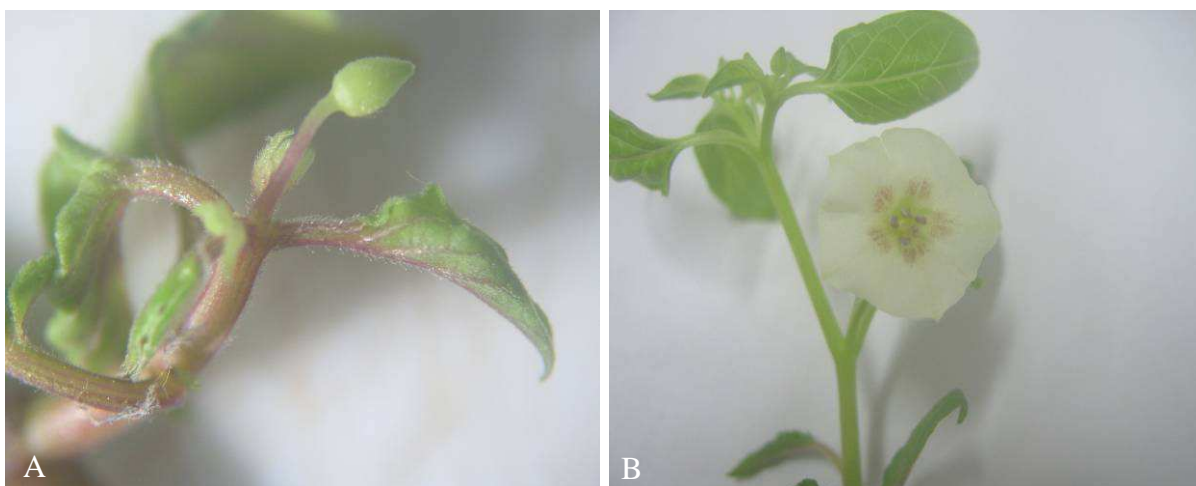


Figura 16 - Brotos em estágio produtivo de camapú in vitro A. detalhe da emissão de botões florais, B. detalhe da disposição de flor em brotos adventícios.

O comprimento da maior raiz foi marcadamente influenciado pela concentração de nitrogênio fornecido ao meio de cultura. Nos tratamentos com ausência de nitrogênio, apesar das plantas terem desenvolvido raiz, estas apresentaram os menores comprimentos, e decresceram à medida que se aumentaram as concentrações de sacarose.

Os dados indicam que a adição do nitrogênio no meio de cultura, proporcionou um aumento significativo no comprimento da raiz simultaneamente com a concentração de sacarose.

Mas, os tratamentos que proporcionaram melhores resultados foram os que continham no meio de cultura $\frac{1}{2}$ de MS combinados com 30 g.L^{-1} de sacarose, alcançando em média $5,79 \text{ cm}$ de comprimento de raiz (Figura 17). A partir dessa concentração de nitrogênio inorgânico, observou-se uma tendência à queda no comprimento da parte aérea obtida. Schmidt (2007) sugere que exista uma ótima concentração de reserva de carbono na qual acima ou abaixo a formação de raízes adventícias seja inibida.

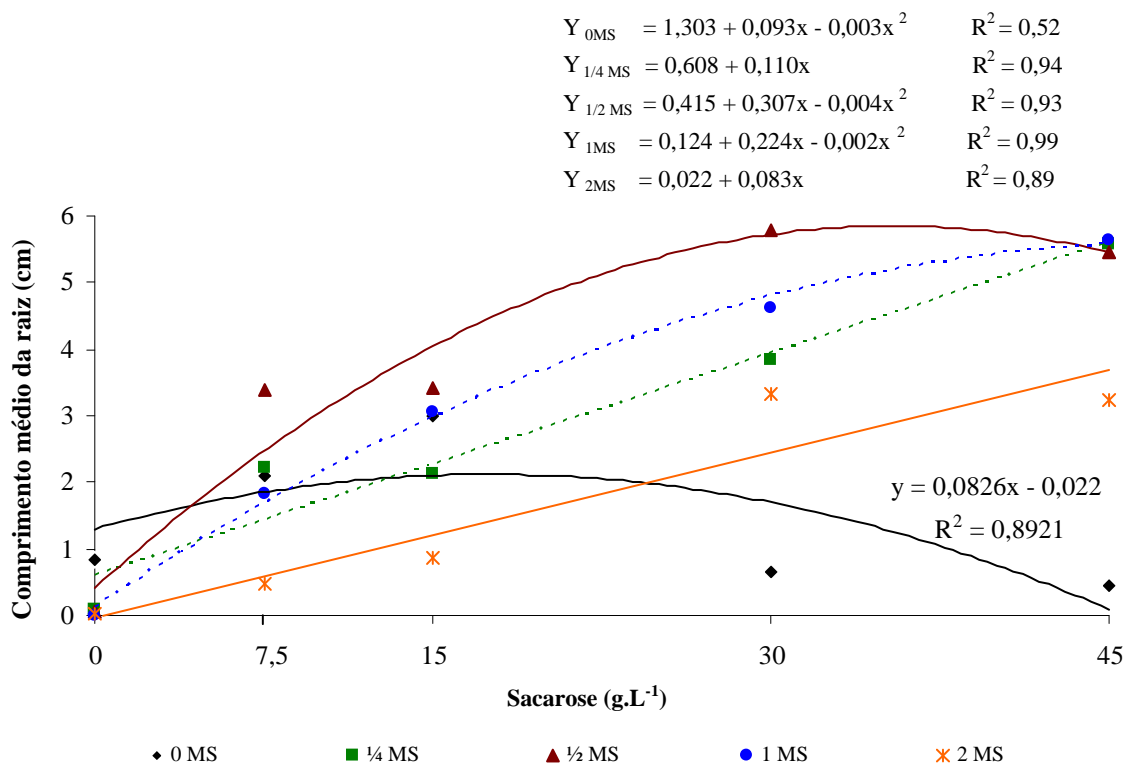


Figura 17 - Número médio de raízes emitidas por explantes de camapú (*Physalis angulata* L.), aos 40 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes combinações de sacarose e nitrogênio

O número de raízes por explante e a qualidade destas raízes, que resultam em um sistema radicular bem desenvolvido, são características que certamente irão facilitar o desenvolvimento das plantas durante o processo de aclimatização. De forma geral, evidenciou-se que a adição do nitrogênio inorgânico e da sacarose no meio de cultura é extremamente importante no desenvolvimento de brotos de camapú (Figura 18).

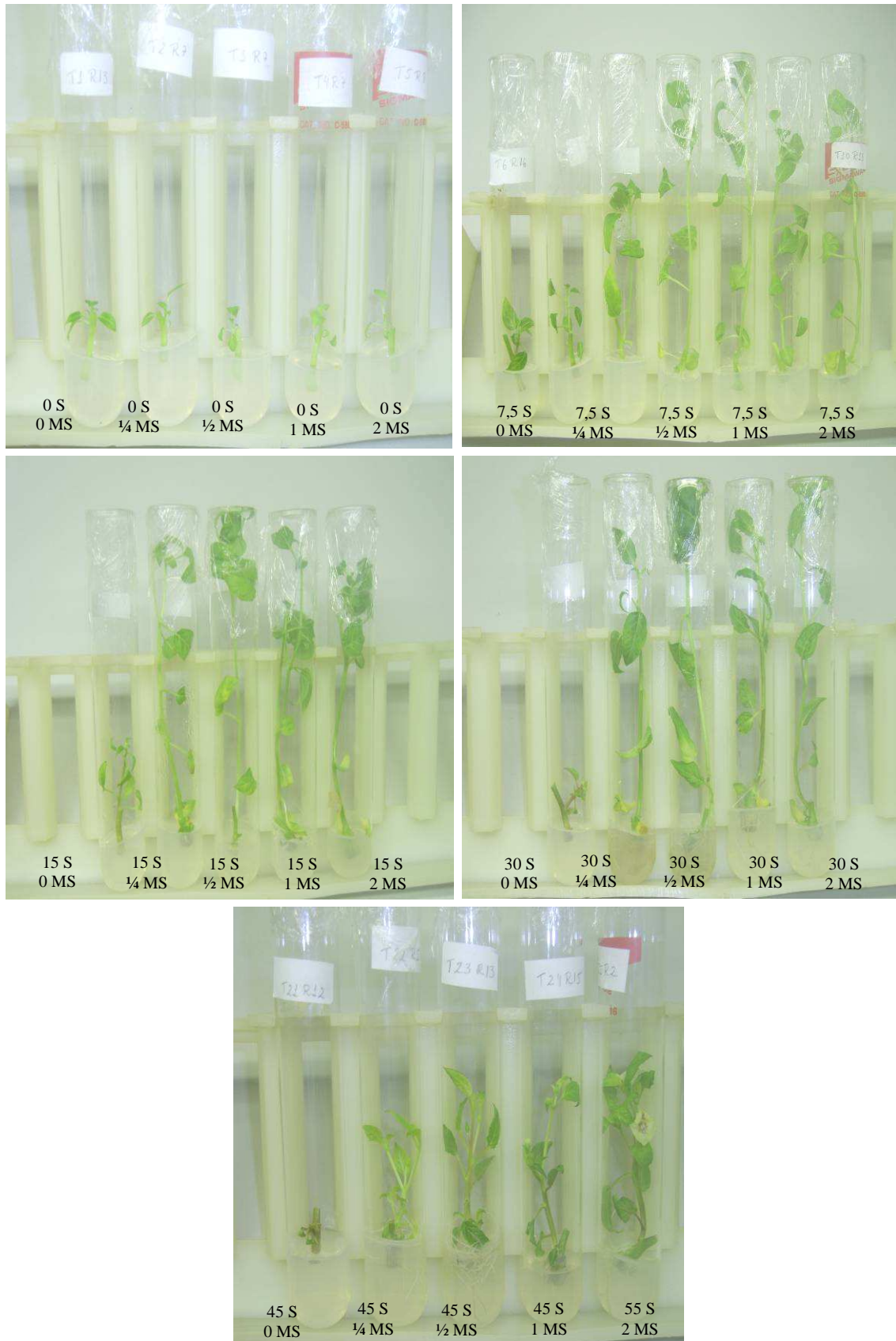


Figura 18 - Aspecto visual do efeito das diferentes combinações de sacarose e nitrogênio no desenvolvimento de explantes de camapu (*Physalis angulata* L.), aos 40 dias de cultivo *in vitro*. S = sacarose, MS= meio Murashige & Skoog.

4.3 Substratos para aclimatização de plantas micropropagadas de camapú

As plântulas de camapú, antes de serem aclimatadas, apresentavam comprimento médio de 13,31 cm, 13,49 folhas, 2,47 botões flores, raiz com 6,41 cm de comprimento e peso da matéria fresca de 1,53 g. Em geral, a composição do meio e o ambiente *in vitro* alteram o desenvolvimento anatômico e fisiológico das plantas, levando a uma alta taxa de transpiração após o plantio. Estudos conduzidos por Larcher (2000) relatam que o crescimento vigoroso, após o plantio, depende do desenvolvimento de novas folhas mais adaptadas às condições *ex vitro*. De fato, o processo de adaptação do camapú foi intensificado à medida que novas brotações foram se desenvolvendo a partir da segunda semana após o transplantio.

Após 60 dias de aclimatização, observaram-se diferenças significativas quanto à porcentagem de sobrevivência, peso médio da matéria fresca, comprimento da planta, número de folha, comprimento da raiz e número de botões florais emitidos por planta (Tabela 5)

Fonte de variação	de GL	QM					
		% de sobrevivência	Matéria fresca (mg)	Comprimento médio da planta (cm)	Número médio de folha	Comprimento médio da raiz (cm)	N. médio de botão floral
Substrato	5	0,618*	2,247*	6,40**	9,367**	8,805*	8,774*
Resíduo	84	0,033	0,129	1,900	2,412	2,575	0,511
C.V. (%)		18,00	23,28	31,30	36,10	44,10	44,53

Tabela 5 - Resumo da análise de variância do efeito dos substratos na proliferação de brotos de camapú (*Physalis angulata* L.) UFAM, Manaus, 2008.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Durante a aclimatização, o substrato contendo a mistura vermiculita + terriço de mata apresentou o percentual de 100% de sobrevivência de plantas micropropagadas de camapú. Enquanto que os substratos plantimax® e terriço de mata proporcionaram os menores percentuais de sobrevivência de mudas, 13,33 e 6,67% respectivamente (Figura 19).

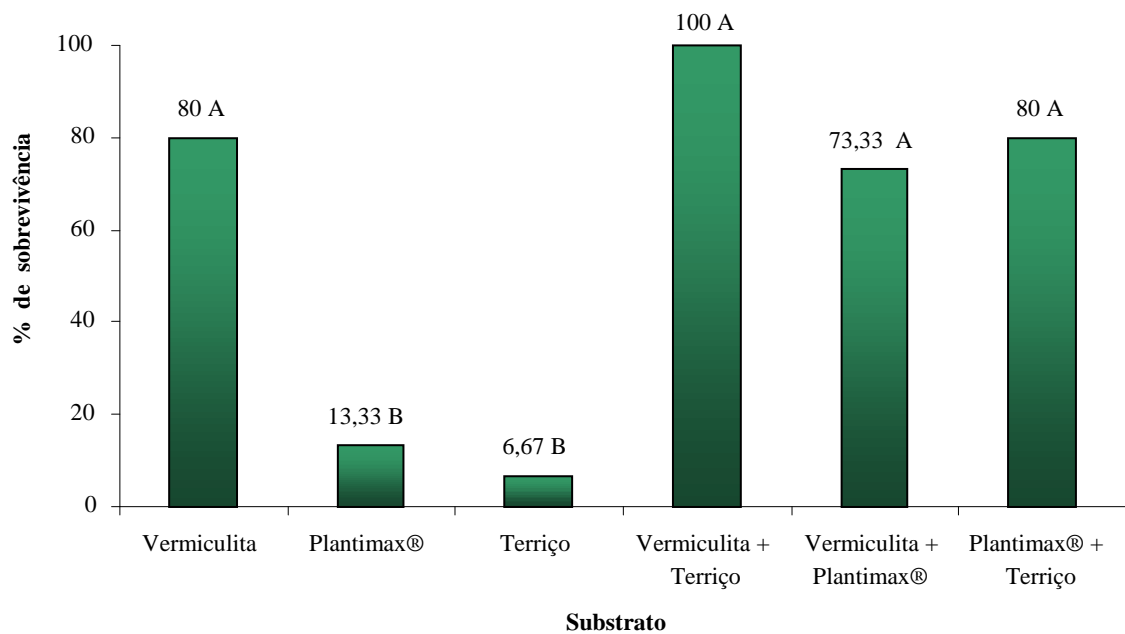


Figura 19 - Efeito do substrato sobre a sobrevivência de plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Hoffmann (2001) relata a ocorrência de uma queda drástica na sobrevivência das plantas em torno de duas semanas após o início da aclimatização, mencionando que este fato é causado em virtude do estresse sofrido na transferência das plantas do laboratório para a casa de vegetação e pela baixa eficiência na troca do metabolismo heterotrófico para o autotrófico.

No início da aclimatização das plântulas de camapú, verificou-se a ocorrência de queda foliar durante a primeira semana de cultivo, independentemente dos substratos testados. A abscisão foliar, durante a aclimatização de plantas cultivadas *in vitro*, parece ser um fenômeno comum em resposta às mudanças fisiológicas e morfológicas devidas à alteração do ambiente.

O comprimento da parte aérea das plantas aclimatadas obteve melhores resultados quando cultivado no substrato, contendo a mistura de vermiculita + terriço de mata apresentando em média 31 cm. Seguido dos tratamentos com terriço de mata e vermiculita + plantimax®, os quais não diferiram estatisticamente entre si, conforme se observa na figura 20.

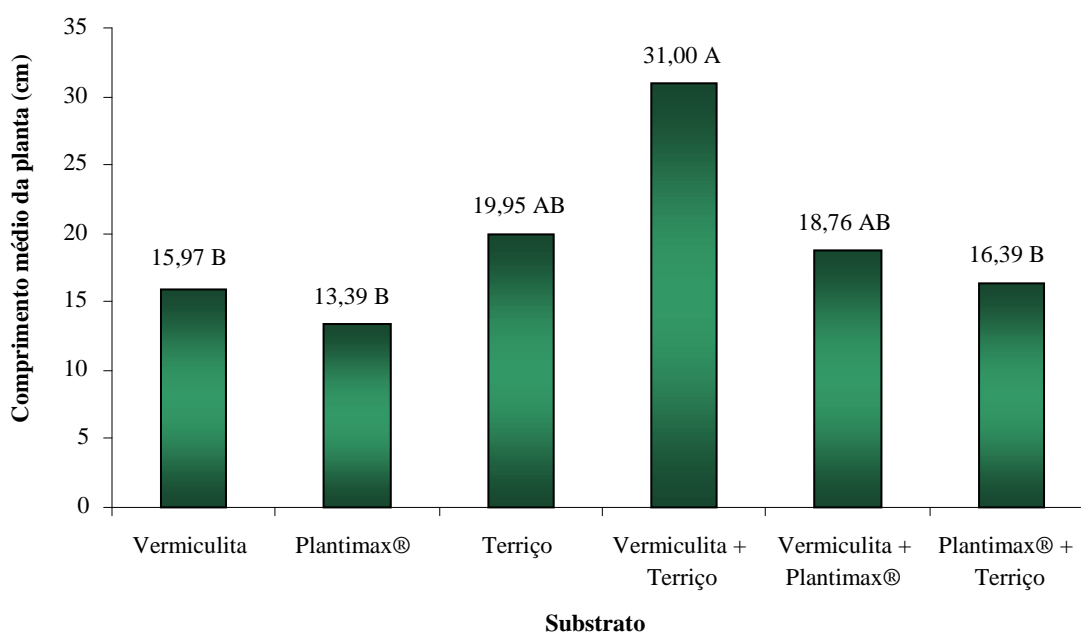


Figura 20 - Efeito do substrato sobre as médias do tamanho das plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

O substrato que apresentou o maior número de folhas foi a mistura de vermiculita + terriço de mata, tendo em média 33,27 folhas produzidas por planta. A vermiculita e terriço de mata quando aplicados isoladamente também apresentaram o segundo e terceiro melhor resultado, sem distinção estatística entre si (Figura 21). A presença de botões florais foi constatada a partir do 52º dia de aclimatização, porém não se verificou durante o período de aclimatização a presença de flores, sugerindo que as plantas na fase de aclimatização precisem de um maior período para iniciar a floração. Vasconcellos (2003) cita que plantas de camapú, quando cultivados em condições de campo, começam a floração após quatro meses.

Os melhores resultados quanto ao número médio de botões florais por planta foram obtidos com o uso do substrato, contendo a mistura vermiculita + terriço de mata, durante a fase de aclimatização, atingindo a média de 6,76 botões florais por planta (figura 22). O substrato plantimax® apresentou a menor média de emissão de botões florais por planta, e o substrato terriço de mata não se constatou a presença de botões florais, estes resultados

indicam a estrutura física do substrato, principalmente no que se refere à manutenção da umidade do solo que, é o fator limitante na produção dos botões florais.

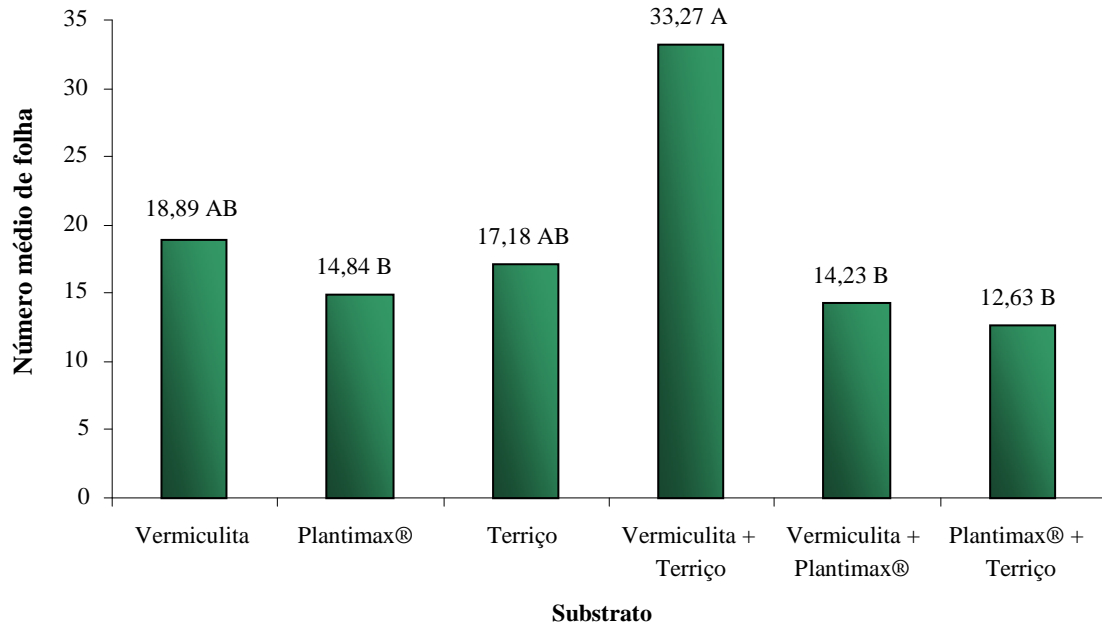


Figura 21 - Efeito do substrato sobre o número médio de folhas das plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

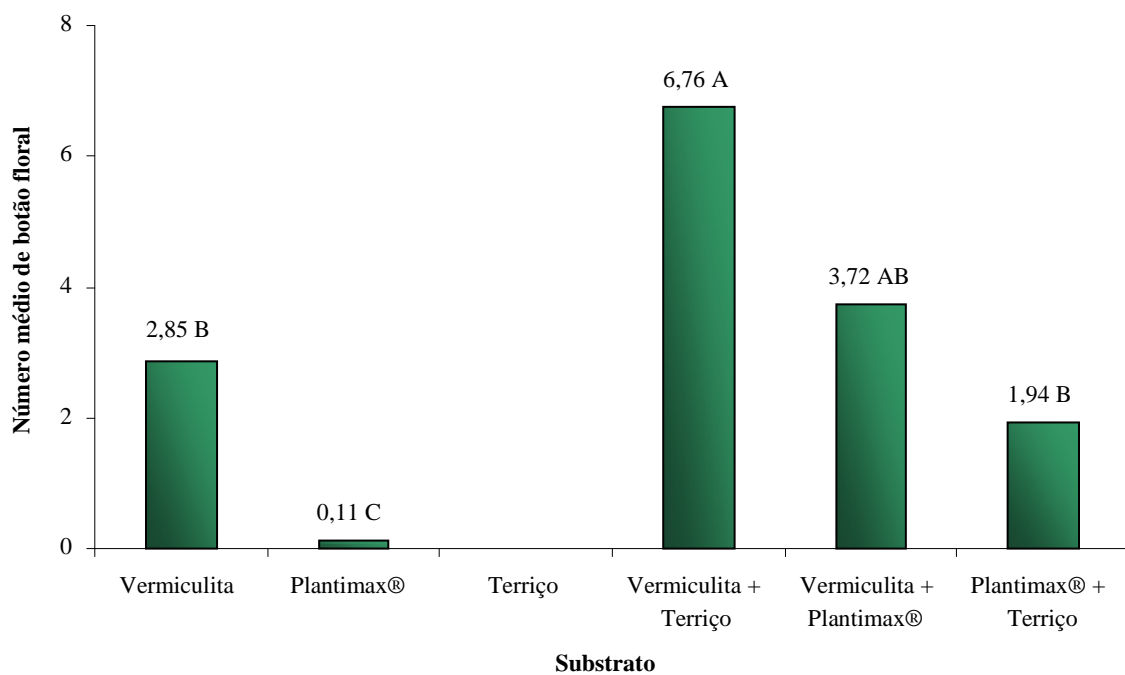


Figura 22 - Efeito do substrato sobre a emissão média de botões florais por planta de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Hartmann (2002) menciona que os principais efeitos dos substratos manifestam-se sobre as raízes, podendo acarretar algumas influências sobre o crescimento da parte aérea. Neste experimento verifica-se uma significativa diferença no comprimento da maior raiz em função do substrato utilizado.

O substrato contendo a mistura vermiculita + terriço de mata apresentou o maior desenvolvimento de raiz, obtendo em média 20,12 cm de comprimento. A vermiculita quando combinada com o plantimax® ou em aplicação isolada também apresentou bons resultados, sem diferirem estatisticamente entre si, conforme se observa na figura 23.

Os resultados também evidenciaram que, apesar de haver o desenvolvimento de broto, nas condições de ausência de nitrogênio, o comprimento dos brotos permaneceu limitado, independentemente da concentração de sacarose.

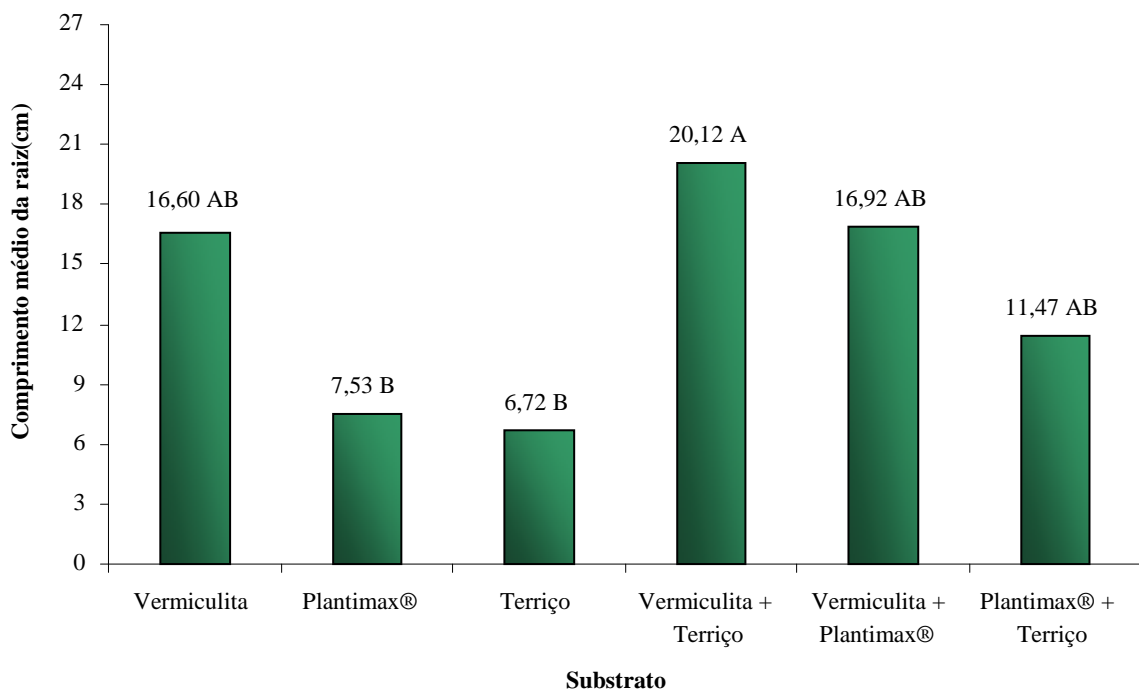


Figura 23 - Efeito do substrato sobre o comprimento médio da maior raiz nas plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

O valor do peso da matéria fresca expressa com fidelidade o desenvolvimento de plantas de camapú aclimatizadas. Assim a maior média para o peso da matéria fresca da

planta, constatou-se no substrato que contém a mistura de vermiculita + terriço, atingindo a média de 4,83g por planta. Este resultado deve-se ao fato de que mistura de substratos proporcionam uma melhora nas características físicas, químicas e biológicas, superando, assim, os resultados quando comparados com a utilização de substratos isolados (Figura 24).

Bossa (2003) relata que a qualidade do substrato de aclimatização passa pela existência de características físicas importantes como, por exemplo, a densidade, porosidade total, espaço de aeração e retenção de água, assim como de características químicas como o pH e o teor de sais solúveis. Hoffmann (2001) destaca que o bom desempenho de um substrato se dá, em geral, pela boa agregação de suas partículas, disponibilidade de nutriente e a adequada drenagem.

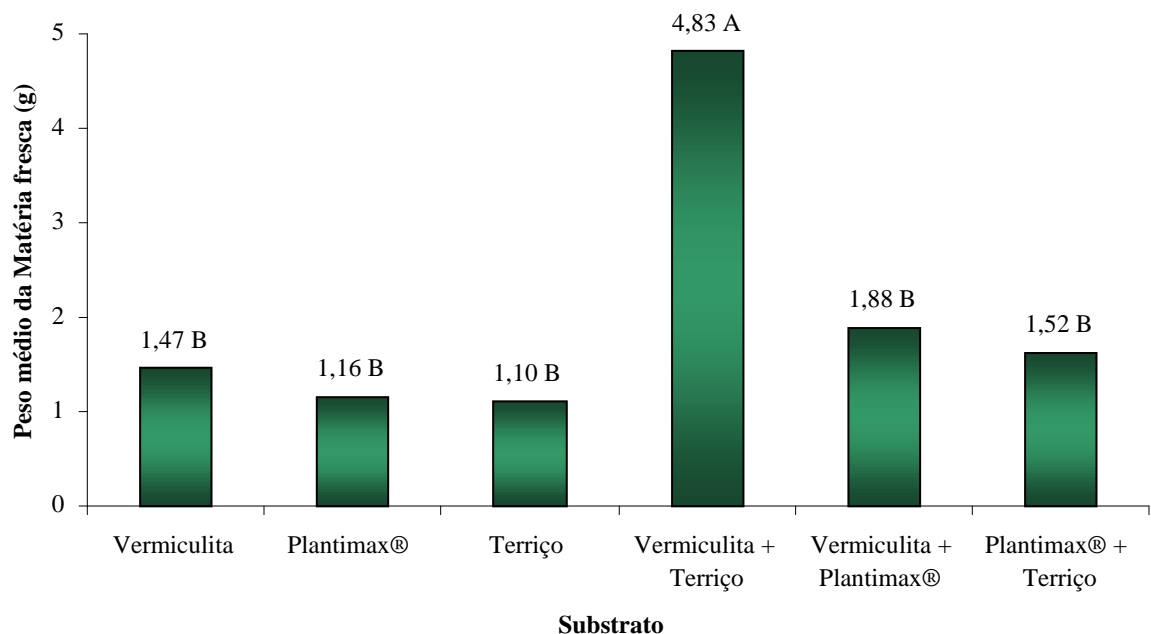


Figura 24 - Efeito do substrato sobre as médias da matéria fresca das plantas de camapú, aos 60 dias de aclimatização. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

O plantimax® apesar de apresentar vantagem pela sua uniformidade de composição química e física, não se diferiu estatisticamente dos substratos que continham terriço de mata e vermiculita sobre o peso médio da matéria fresca das plantas. Neto (1999) menciona que o

substrato comercial plantimax® apesar de possuir boas características físicas, necessita da complementação de nutrientes por meio da aplicação de solução nutritiva, para se obterem mudas de melhor qualidade.

Apesar disso, a vermiculita foi o substrato mais eficiente, provavelmente devido a sua característica física, que segundo Ugarte (2005) é um ótimo condicionador do solo por promover a areação do solo, enquanto retém umidade e estimula a absorção de nutrientes, através das raízes das plantas.

Neste contexto, as plantas de camapú obtiveram um melhor desenvolvimento em todas as características avaliadas nos substratos contendo vermiculita aplicado isoladamente ou em forma de mistura com outros substratos. E, quando combinada com o terriço de mata, proporcionou um melhor desenvolvimento em comprimento da parte aérea e raiz, número de folhas e botões florais e incremento significativo no peso da matéria fresca.

Neste trabalho, o substrato mais adequado à produção das mudas, foi à composição da mistura de vermiculita + terriço de mata, afirmando a grande adaptação do camapú a substratos com baixa e/ou nenhuma adubação química.

5 CONCLUSÃO

Nas condições em que foi desenvolvido o presente estudo, conclui-se que a micropropagação de camapú pode ser feita da seguinte forma.

A inoculação dos reguladores de crescimento AIA e BAP no meio de cultura MS, proporcionou o desenvolvimento de plântulas com características anormais.

Recomenda-se utilizar a concentração $\frac{1}{2}$ MS combinada com 15g.L^{-1} de sacarose, pois promoveu os melhores resultados quanto as características avaliadas para obtenção de mudas de camapú.

Na fase de aclimatização de camapú, o substrato contendo a mistura de vermiculita + terriço de mata (1:1 v/v) promoveu o maior índice de sobrevivência e melhor desenvolvimento no peso médio da matéria fresca, comprimento da planta, número de folha, comprimento da raiz e número de botões florais emitidos por planta.

Assim, sugerimos que experimentos nesta área deverão, não só continuar, mas serem aprofundados com o objetivo de aumentar a eficiência do processo de micropropagação e aclimatação de camapú, visando testar diferentes formulações de meio de cultura e de substratos, que permitam produzir o maior material, número de mudas a baixo custo, o que é desejável em laboratórios de micropropagação.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; LOCATELLI, E.; ROCHA, E.; FORMIGA, S. Plantas medicinais dos Cariris Velhos, PB, Parte I, Subclasse Asteridae. **Revista Brasileira de Farmácia**, Brasil, v. 75, n. 3, p. 61-64, 1994.
- ALVES, E.C.S.C. **Organogênese in vitro na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2001. 54 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Programa de Pós-graduação em Ciências Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ARAÚJO, E.C.; OLIVEIRA, R. A.G.; CORIOLANO, A.T.; ARAÚJO, E.C. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v.8, n.2, p.44-52, jun. 2007.
- BERUTO, M. LANTERI, L. PORTOLAGO, C. Micropropagation of tree peony (*Palonia suffurticosa*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 249-255, 2004.
- BONGA, J.M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.
- BOSA, N.; CALVETE, E.O.; SUZIN, M.; BORDIGNON, L. Avaliação do crescimento de *Gypsophila paniculata* durante o enraizamento *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 510-513, 2003.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos de plantas e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB. 1998. v.1, p. 97-132.
- CALVETE, E.O. **Concentração de sacarose in vitro e seleção de substratos para aclimatização ex vitro de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CANTAGALLO, F. de S.; AZEVEDO, F. A. de; SCHINOR, E. H.; M. FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J. Micropropagação de citrumelo “swingle” pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 136-138, 2005.
- CAVALCANTE, Paulo V. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6. ed. Belém: Museu Paraense E. Goeldi, 1996. 279 p.
- CAVINS, T.J.; DOLE, J.M. Photoperiod, juvenility, and high intensity lighting affect flowering and cut stem qualities of *Campanula* and *Lupinus*. **HortScience**, v. 36, n.7, p.1192-6, 2001.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, 1998.
- CHIANG, H., JAW, S.; CHEN, C.; KAN, W. Antitumor Agent, Physalin F from *Physalis angulata* L., **Anticancer Research**, v. 12, n. 3, p. 837-843, 1992.

COLL, J.B.; RODRIGO, G.N.; GARCÍA, B.S.; TOMES, R. S. **Fisiologia Vegetal**. Madrid: Pirâmide. 1988. 822 p.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Imprensa Nacional, v. 2, 1984.

COSTA, N.M.S; ALOUFA, M.A.I. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical (UFG)**, v. 36, p. 195-198, 2006.

COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29c (*Prunus cerasifera* Ehrh.) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 125-128, 2003.

COZAI, T. & KITAYA, Y. Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. In: M. Terzi, R. Cella, A. Falavigna (Eds.). **Current Issues in Plant Molecular Biology**. Londres: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 659-667.

CUZZUOL, G.R.F; GALLO, L.A; CROCOMO, O.J. Enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* e *ex vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, 1996.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JUNIOR, A. A. Formação de mudas de jabuticabeira (*Plinia* sp.) em diferentes substratos e tamanhos de recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n.1, p. 179-182, 2007.

DONATO, V.M.T.; ANDRADE, A.G; CAMARA, T. R. Variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de nitrogênio. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1289-1292, out./dez. 1999.

DUKE, J.A.; VASQUEZ, R. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. Florida: CRC Press, 1994. 215 p.

ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L. B; DELAMARE, A. P. L.; BERTARELLO, A. L. ; CARRER, R. . Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais.. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Orgs.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária Ltda, 2001. p. 257-278.

ELANGOMATHAVAN, R. High frequency *in vitro* propagation of kidney tea plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 83-86, 2003.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, p. 105-124. 2003.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *pfaffia glomerata* e *pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. England: Exegetics, 2. ed., v.1, 1993. 575 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Orgs.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1998. p. 99-170.

GULLO, C.; PEREIRA, C. Medicina alternativa, ou cura no jardim. **Revista Isto É**, v. 1513, n. 30/09, p.72-78, 1998.

HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. E. **Biotechnology of perennial fruit crops**. Wallingford: CAB International, 1992. 550 p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

HASEGAWA, P.M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.105, p. 216-220, 1980.

HASRAT, J.A.; DE BACKER, J.P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A.J. Medicinal plants in Suriname: Screening of plant extracts for receptorbinding activity. **Phytomedicine**, v. 4, p. 59-65, 1997.

HAZARICA, B.N. Acclimatization of tissue culture plants. **Current Science**. v. 85, p. 1174-1712, 2003.

HERATH, S.P.; SUSUKI, T.; HATTORI, K. Multiple shoot regeneration form young shoots of kenaf (*Hibiscus cannabinus*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 49-53, 2004.

HOFFMANN, A. Acclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 21-24, 2002.

HOFFMANN, A. Apresentação. In: **Seminário Brasileiro Sobre Pequenas Frutas**, 1, Bento Gonçalves. Bento Gonçalves: [s.n.]. p. 6. 2003.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira "marubakaido". **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n.2, p. 462-467, 2001.

KÄMPF, A.N. **Produção comercial de mudas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária. 2000. 254 p.

KISSMANN, K. G., GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas** -Tomo III. São Paulo: BASF, 1995. 683 p.

KUZEY, W.E.; ALLEN HAMMER, J.; WEILER, T.C. In vitro propagation of *Typhosiphila paniculata* L. "Bristol Fairy". **HortScience**, v.15, n.5, p. 600-601, 1980.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LEE, C.W.; SKIRVIN, R.M.; SOLTERO, A.I.; JANICK, J. Tissue culture of *Salpiglossis sinuata* L. from leaf discs. **HortiScience**, v.12, n.16, p.547-549, 1977.

LIMA, C.R; COSTA-SILVA, J.H.; LYRA, M.M.A.; ARAÚJO, A. V.; ARRUDA, V. M.; DIMECH, G. S.; EVÊNCIO, L.B.; FRAGA, M.C.C.A.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A.G. Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-Clínico do Fitoterápico Sanativo®. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 544-9, 2006.

LIMA FILHO, O. F. de; MALAVOLTA, E. Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 1-2, 1997.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. E. (Eds.) **Biotechnology of perennial fruit crops**. California: CAB International, 1992. p. 3-34.

LOE, N.H. Micropropagation of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe): a valuable medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 81-119, 2005.

LOPES, D.C.; FREITAS, D.X.P; ZAIDA, M.F., SANTOS, E.P.; TOMASSINI, T. C.B. 2006. *Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de Physalis angulata* L., João Pessoa, v. 16, n. 2, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2006000200013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 01 julho 2008.

LORENZI H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. p. 346-347.

MARTINUSSEN, I.; NELSEN, G.; SVENSON, L. *In vitro* propagation of choudbery (*Rubus chamaemorus*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 43-49, 2004.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: UFC, 2000. 346 p.

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

NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 25-31, 1994.

NETO, A. A. Avaliação de substratos alternativos e tipos de adubação para a produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.2, p.270-280, 1999.

NURIT SILVA, K.; AGRA, M.F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.4, p. 344-351, 2005.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., Vacaria. **Anais ... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho**, 2003. p. 9-14.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159 p.

- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: Meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1997. 348 p.
- PIETRO, R.C.L.R, Planta contra tuberculose. **Pesquisa FAPESP**, julho 2001. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=1376&bd=1&pg=2&lg=>>>. Acesso em: 21 março 2008.
- PITELLI, A.M.C.M. **Controle hormonal do crescimento de raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cv. Micro-Tom. em condições de déficit hídrico**. 2006. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 905 p.
- RIBEIRO, I. M.; SILVA, M. T. G.; SCARES, R. D. A.; STUTZ, C. M.; BOZZA, M.; TOMASSINI, T. C. B. *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, *in vitro*, evaluation fromit's stems and fruit capsules. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12 (Supl), p. 21-22, 2002.
- ROSSAL, P.A.L.; FRANKE, A.E.; MARKMANN, C.A.; CANSIAN, E.E.; SILVEIRA, P.R. ***Physalis angulata* (L), uma alternativa de produção para a região litoral de Santa Catarina**. Disponível em: <http://www.caaq.ufsc.br/anais_mct/agrarias/agrarias3.pdf> Acesso em: 25 agosto 2007.
- RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 33, p. 57-63, 2003.
- SARITHA, K.V.; NAIDU, C.V. *In vitro* flowering of *Withania somnifera* Dunal - An important antitumor medicinal plant. **Plant Science**, v. 172, p. 847-851, 2007.
- SCHWERTNER, A.B.S.; NAGAO, E.O.; HIDALGO, A.F.; ZAFFARI, G.R. Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na propagação *in vitro* da caapeba (*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.1, p.76-81, 2008.
- SILVA K.N.; AGRA, M.F.. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 344-351, 2005
- SILVA, A.H.B.; OSUNA, J.T.A.; SOUZA, M.F. Caracterização morfológica de frutos de camapú (*Physalis angulata*). Disponível em: **Congresso Brasileiro de Olericultura: Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 155-155, 2006.
- SILVA, A.T.; PASQUAL, M.; ISHIDA, J.S.; ANTUNES, L.E.C. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.1, p.49-53, 1995.

SILVA, C.G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.1, p. 29-35, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFSC, 3. ed., 2000. 500 p.

SIVANESAN, I.; JEONG, B.R. Micropropagation and *in vitro* flowering in *Pentanema indicum* Ling. **Plant Biotechnology**, v. 24, p.527-532, 2007.

SOARES, M. Alívio multiplicado: Substâncias extraídas do camapu são 30 vezes mais potentes que os antiinflamatórios hoje conhecidos. **Pesquisa FAPESP**, 2003. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/novo_site/extras/imprimir.php?id=2227&bid=1>. Acesso em: 20 março 2007.

STUMPF, E.R.T.; GROLLI,P.R.; SCZEPANSKI, P.H.G. Efeito do ácido indolbutírico, substrato e tipo de estaca no enraizamento de *Chamaecyparis lawsoniana* Parl. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7 n. 2, p. 101-105, 2001.

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

TORRES, C.T.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1998. 509 p.

UGARTE, J.F.O; SAMAPIO, J.A; FRANÇA, S.C.A. **Vermiculita**. CETEM, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <<http://www.cetem.gov.br/publicacao/CTs/CT2005-143-00.pdf>>. Acesso em: 04 março 2008.

VASCONCELLOS, A.G.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A. *In vitro* flowering of *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 1, p. 23-27, 2003.

ZHANG, Z.; LEUNG, D.W.M. Factors influencing the growth of micropropagated shoots and *in vitro* flowering of gentian. **Plant Growth Regulation**, n. 36, p. 245-251, 2002.

ZIV, M. Developmental and structural paterus of *in vitro* plants. In: SOH, W.Y; BHOJWANI, S.S. **Morphogenesis in plant tissue cultures**. London: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 235 - 253.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST: Sistema de análise Estatística para Microcomputadores**. Pelotas: UFPel, 1987. 75 p.