



MICROPROPAGAÇÃO DE NONI

Daniel da Silva¹; Messe Elmer Torres da Silva¹; Jorge Luis Rodriguez Manrique¹;
Fábio Oliveira Maciel²; Milena Gaion Malosso³

¹Mestrando, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas (MBT/UEA), Manaus, AM – Brasil.
(danieldasilva23@gmail.com)

²Prof. Msc. Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (ISB/UFAM), Coari, AM – Brasil.

³Profa. Dra. Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (ISB/UFAM), Coari, AM – Brasil.

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para rápida multiplicação *in vitro* de Noni, o que é inédito para esta espécie medicinal com atividade biológica, contra o câncer, uma vez que o suco do fruto é rico em polissacarídeo imunomodulatório contra tumores do tipo sarcoma denominado Noni-ppt. Sementes advindas de frutos maduros foram submetidas a três concentrações de hipoclorito de sódio. Brotos axênicos resultantes do tratamento com 0,50% deste agente desinfestante foram utilizados como fonte de explantes para quatro experimentos de multiplicação. O meio de cultura indicado foi o B5/2 suplementados com 0,1 mg/L⁻¹ de BAP e 3,0 mg/L⁻¹ de IBA, uma vez que este promoveu a maior taxa de multiplicação e 100% de enraizamento *in vitro* dos explantes, além da ausência total de calos, quando comparado com os demais tratamentos aplicados a esta espécie, e que os substratos terra (100%) e terra-areia (1:1) foram os mais indicados para aclimação, ambos apresentando 83,33% de plantas vivas. Deste modo, esta espécie pode ser produzida em larga escala pelo protocolo aqui estabelecido.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade anticancerígena, Micropropagação, *Morinda citrifolia* L., Plantas medicinais.

NONI MICROPROPAGATION

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a protocol for rapid *in vitro* multiplication of Noni, which has no precedents for this medicinal specie with biological activity against cancer, once the juice of its fruits is rich in immune-modulatory polysaccharide against tumors of sarcoma type, named Noni-ppt. Seeds arisen from mature fruits were submitted to three concentrations of Sodium Hypochlorite. Resulting axenic sprouts from treatment of 0.5% of this disinfecting agent were used as source of explants for three multiplication experiments. The indicated culture medium was B5/2 supplemented with BAP 0.1 mg/L⁻¹ and IBA 3.0 mg/L⁻¹, once this medium promoted a higher multiplication rate of 100% rooting of explants *in vitro*, besides the total absence of callus, when compared to other treatments applied to

this specie, and the treatments soil (100%) and soil-sand (1:1) were the most indicated to acclimatization, both showing 83.33% of alive plants. By this way, this specie can be produced in large scale by the protocols here established.

KEYWORDS: Anti-cancerogenic activity, micropropagation, *Morinda citrifolia* L., Medicinal plants.

INTRODUÇÃO

A *Morinda citrifolia* L. é uma espécie medicinal nativa do Sudeste da Ásia popularmente conhecida como Noni, pertencente à família Rubiaceae, sendo cultivada na Polinésia, Índia, Austrália, Américas Central e Sul (NELSON, 2005; RAZAFIMANDIMBISON et al., 2010). O suco de seu fruto é rico em polissacarídeo imunomodulatório contra tumores do tipo sarcoma denominado Noni-ppt (FURUASAWA et al., 2003; AKIHISA et al., 2007). Segundo CORREIA (2010), este suco vem sendo utilizado na medicina popular para o tratamento de doenças e/ou distúrbios tais como: diabetes, diarreia, dores, hipertensão, artrite, estresse e câncer.

Esses estudos têm revelado e confirmado algumas das atividades biológicas da planta, descritas pelos povos polinésios, como atividade antioxidante, antiinflamatória, analgésica, imunomoduladora, antibacteriana, antitumoral, entre outros (BASAR et al., 2010; YANG et al., 2010). Esta espécie está exposta à erosão genética provocada pela coleta indiscriminada e pelos frequentes desmatamentos provocados pelo homem (PAWLUS & KINGHORN, 2009). O trabalho de conservação de uma espécie, ou de um grupo delas, deve ser sempre abrangente e incluir o estudo do ecossistema em que elas estão inseridas para que o trabalho de proteção contra a erosão genética e/ou que evite sua extinção seja de fato efetivo. Por isso, se faz necessária a adoção de metodologias biotecnológicas para a conservação desta espécie *in vitro*.

A Cultura de Tecidos Vegetais é o conjunto de técnicas utilizadas para cultivar *in vitro* células e tecidos vegetais em meio nutritivo sintético, de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais visando produzir uma nova planta (RIBEIRO, 2010; CARVALHO et al., 2011). Essas técnicas apresentam importância prática para área agrícola e florestal, onde aparecem como uma das metodologias mais polivalentes que tem como um dos principais objetivos oportunizar uma alternativa de manipular plantas, inclusive em nível molecular quando necessário. Além disso, tem conquistado destacada posição na recuperação de doenças; na propagação comercial de plantas; no melhoramento genético; no manejo, no intercâmbio e na conservação de germoplasma; e em outras aplicações com as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários (JUNGHANS & SOUZA, 2013).

Uma das principais técnicas de cultura de tecidos vegetais é a micropropagação que visa uma alta produção de mudas em curto espaço de tempo e em área física bastante reduzida, quando comparada com as técnicas de produção de mudas convencionais, além de garantir a fitossanidade das mudas micropropagadas e, conseqüentemente seu conseqüente vigor, garantindo um material vegetal de qualidade superior ao obtido pelos métodos tradicionais (ROCHA, 2009; JUNGHANS & SOUZA, 2013).

Portanto, o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para o Noni, o que é inédito para esta espécie medicinal torna-se importante ferramenta para a produção de biomassa vegetal, principalmente porque esta espécie já

apresenta uso potencial como fitoterápico, mas não apresenta ainda nenhum estudo sobre sua biologia reprodutiva e ecologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Instituto de Saúde e Biotecnologia em Coari-AM, da Universidade Federal do Amazonas. As plantas utilizadas neste trabalho foram compradas na Feira Municipal de Coari-AM. O experimento foi realizado no período de janeiro a outubro de 2012. Para os testes de assepsia foram utilizadas sementes advindas de frutos maduros, que foram despolidos. As sementes então foram lavadas com detergente ODD[®] neutro e enxaguadas em água corrente por um minuto. Em seguida, foram imersas em solução de Benomil 0,5% (m/v) por uma hora por agitação orbital constante a 100 rpm, seguida de um banho em solução de álcool 70% por um minuto e então imersas em solução de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,10; 0,25 e 0,50% (m/v) respectivamente, por 30 minutos, sob a mesma agitação.

Ao término de cada etapa de desinfestação, os explantes foram lavados três vezes com água destilada estéril e inoculados em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) basal estéril, acrescido de 30,0 g/L⁻¹ de sacarose e 8,0 g/L⁻¹ de agar-agar, com pH aferido em 6,0. Após 30 dias, os explantes foram avaliados quanto à presença ou ausência de fungos e bactérias, e também quanto a sua porcentagem de sobrevivência.

Três experimentos foram montados para desenvolver o protocolo de multiplicação *in vitro* desta espécie. No primeiro experimento, segmentos nodais foram retirados de plântulas de *Morinda citrifolia* L. axênicas crescidas *in vitro* por quatro meses e então foram inoculados em meio de cultura MS suplementados com 6-Benzilaminopurina (BAP), Kinetina (KIN) e Thidiazuron (TDZ) nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 3,0 e 5,0 mg/L⁻¹ respectivamente, todos suplementados com 30,0 g/L⁻¹ de sacarose, 8,0 g/L⁻¹ de agar-agar e pH aferido à 6,0. No segundo experimento, explantes obtidos a partir de plântulas crescidas *in vitro* em meio de cultura MS foram inoculados, respectivamente, em meio de cultura Wood Plant Medium (WP), MS e B5 Gamborg (B5) nas concentrações originais, bem como em suas concentrações diluídas pela metade e pela quarta parte, todos suplementados com 0,1 mg/L⁻¹ de BAP, 30 g/L⁻¹ de sacarose, 8,0 g/L⁻¹ de agar-agar e pH aferido em 6,0. No terceiro, segmentos nodais de 5,0 cm de altura foram retirados de plântulas crescidas *in vitro* e então inoculadas no meio de cultura B5/2 acrescido de 0,1 mg/L⁻¹ de BAP e suplementado com 30 g/L⁻¹ de sacarose, 8,0 g/L⁻¹ de ágar e Ácido anafalenoacético (ANA), Ácido indol-3-acético (AIA) e Ácido indol-3-butírico (IBA) nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 3,0 e 5,0 mg/L⁻¹ respectivamente, todos com pH aferido a 6,0. Para estes experimentos foram utilizados 30 explantes por tratamento.

Todos estes experimentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2° C, 60±5% de umidade relativa e 16 horas de fotoperíodo com intensidade luminosa de 2.0x10⁷ μE.cm⁻².s⁻², provenientes de duas lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85W). Após 30 dias, todos os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de explantes com brotação, ao número de brotos por gema, número de gema por haste, taxa de multiplicação, altura das brotações, presença de calos e raízes.

Para a aclimação desta espécie, plântulas enraizadas *in vitro*, com parte aérea de aproximadamente 6,0 cm de altura foram plantadas em bandejas de

polietileno sem divisória com dimensões 41x27x8 (comprimento, largura e altura) compostas, respectivamente, pelos seguintes substratos: 100% areia, 100% terra e 1:1 terra:areia, onde foram mantidas em condições ambientais e sob irrigação diária. Todos os substratos foram autoclavados por uma hora a 120°C antes do transplante das mudas. Para este trabalho foram utilizados 18 explantes por tratamento. Estas plântulas foram mantidas cobertas por frascos de vidro transparente durante 30 dias, na casa de vegetação, quando, então, os vidros foram retirados. Após 30, 60 dias do plantio, as plântulas foram avaliadas quanto a sua sobrevivência ou não em ambiente *ex vitro*.

O delineamento experimental adotado em todos os experimentos acima foi inteiramente casualizado e para a comparação das médias dos tratamentos foi utilizado o Teste de Tukey ao nível de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Assepsia de sementes de *Morinda citrifolia* L.

A assepsia do material vegetal é de fundamental importância na micropropagação e, sendo efetuada com sucesso, evitará contaminação no meio de cultura por fungos e bactérias, que ocasionam perdas do material vegetativo e do meio de cultura e, por isso, é necessário enorme cautela em relação a esta etapa, desde o corte do material no campo até o manuseio na câmara de fluxo laminar (XAVIER et al., 2009).

Os tratamentos de assepsia realizada em sementes de *Morinda citrifolia* L. foram eficazes, uma vez que promoveram sementes vivas e axênicas (Tabela 1). A assepsia indicada para as sementes desta espécie é o tratamento com 0,50 mg/L⁻¹ de hipoclorito de sódio, uma vez que este proporcionou 100% de sementes vivas e sem contaminação por fungos ou bactérias. A contaminação por fungos de 3,33% observada neste tratamento foi devido à penetração de formigas no frasco, contaminando-o. Também pode-se observar na Tabela 1 que a contaminação por fungos foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de hipoclorito de sódio, o que indica que concentrações muito baixas deste agente desinfetante não são eficazes na eliminação de fungos.

TABELA 1. Porcentagem de desinfestação de sementes de Noni com três diferentes diluições de hipoclorito de sódio. Coari-AM, 2012.

Tratamento com hipoclorito de Sódio (%)	Explantes vivos (%)	Contaminação por Bactéria (%)	Contaminação por Fungos (%)
0,10	100	0,00	56,67
0,25	100	3,33	26,67
0,50	100	0,00	3,33

Ainda na Tabela 1 é possível verificar que o hipoclorito de sódio não é tóxico para as sementes desta espécie, pois, mesmo quando estas são expostas a altas concentrações deste agente desinfetante continuam vivas e após a germinação apresentam-se vigorosas.

FERMINO JUNIOR et al., (2009) descrevem que um dos maiores problemas diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica e que, além dessas contaminações superficiais, é freqüente se deparar com contaminações presentes no interior dos tecidos, conhecida como contaminação endógena, mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo. No entanto, este não é caso do Noni, pois os segmentos nodais, mesmo após várias repicagens, não apresentaram extravasamento de microrganismos endofíticos no meio de cultura. SILVA et al., (2010) ressaltam que medidas devem ser tomadas no intuito de manter todo o sistema sob condições assépticas, especialmente em relação ao explante, recipiente de cultivo e instrumentos.

Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número médio e na altura média das brotações de segmentos nodais de *Morinda citrifolia* L.

Através dos experimentos realizados com diferentes concentrações das citocininas TDZ, BAP e KIN (Tabela 2), fica indicado, para a multiplicação *in vitro* de *Morinda citrifolia* L., o tratamento com 0,1 mg/L⁻¹ de BAP, uma vez que este proporcionou a maior taxa de número de brotos por gema (1,66), apresentou 100% de plântulas enraizadas, uma excelente taxa de multiplicação (5,10), além de não ter induzido calos, quando comparado com os demais tratamentos.

TABELA 2. Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas no desenvolvimento *in vitro* de explantes ⁽¹⁾ de Noni. Coari- AM, 2012.

Reguladores de Crescimento Vegetal	Nº de Brotos por Gema (*)	Nº de Gemas por Haste (**)	Taxa de Multiplicação (*) x (**)	Altura do Broto (cm)	Presença de Calos (%)	Presença de Raiz (%)
BAP (mg/L⁻¹)						
0	1,63 ab	3,20 a	5,22	0,38 a	0,00 b	0,00 b
0,1	1,66 a	3,07 a	5,10	0,36 a	0,00 b	100 a
1,0	1,52 ab	2,59 ab	3,94	0,27 ab	96,6 a	100 a
3,0	1,13 bc	2,07 bc	2,34	0,21 bc	93,3 a	100 a
5,0	0,87 c	1,53 c	1,33	0,14 c	6,67c	100 a
TDZ (mg/L⁻¹)						
0,1	1,40 a	1,04 a	1,46	0,42 a	0,00 d	0,00b
1,0	1,10 ab	0,90 a	0,99	0,44 a	23,33 b	0,00b
3,0	0,83 b	0,70 a	0,58	0,25 b	16,67bc	0,00b
5,0	0,83 b	0,80 a	0,66	0,23 b	13,33bc	0,00b
KIN (mg/L⁻¹)						
0,1	1,00 a	0,38 a	0,38	0,38 a	26,67 b	0,00b
1,0	0,77 a	0,22 ab	0,17	0,22 ab	10,00 bc	0,00b
3,0	0,27 b	0,06 b	0,02	0,06 b	3,33 c	0,00b
5,0	0,83 a	0,29 a	0,24	0,29 a	0,00 d	0,00b

⁽¹⁾ Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

(*) x (**): Taxa de multiplicação obtida pelo número de brotos por gema multiplicado pelo número de gemas por haste (SANTOS et al., 2006).

Embora o tratamento indicado, quando comparado com o do meio MS, mostre um número reduzido de gema por haste (3,20), menor taxa de multiplicação (5,22) e menor altura do broto, estas características analisadas não apresentaram diferença estatística significativa entre estes tratamentos e o meio MS com acréscimo de 0,1 mg/L⁻¹ de BAP induziu 100% de plântulas enraizadas enquanto o meio MS sem adição de fitorreguladores não induziu enraizamento (Tabela 2). Este fato é muito importante, pois indica que pode-se pular a etapa de enraizamento *in vitro*, o que barateia os custos do protocolo de micropropagação desta espécie.

Segundo REZENDE et al., (2011) os tratamentos acrescidos de pequenas concentrações de citocininas, além de menos onerosos, apresentam ainda menor probabilidade de indução de variação somaclonal, que é uma característica imprópria para um protocolo de micropropagação, processo este que produz clones elite de uma determinada espécie e, alterações genéticas nestes indivíduos podem levar à perda justamente da característica desejada.

FLORES et al., (2009) ao compararem o efeito de BAP e TDZ na multiplicação *in vitro* de brotações de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, relataram que BAP apresentou efeito superior quanto à produção de brotações, além de induzir reduzida formação de calo. No entanto, com relação à *M. citrifolia* o TDZ e a KIN, mostraram-se menos efetivos na taxa de multiplicação desta espécie (Tabela 2).

Experimento 3: Diluição dos meios basais no número médio e na altura média das brotações de segmentos nodais de *Morinda Citrifolia* L.

De acordo com a Tabela 3, não existe diferença estatística significativa para as características número de brotos por gema, número de gemas por haste, taxa de multiplicação, altura do broto e presença de raiz nos tratamentos MS/2, MS/4, WP, B5/2 e B5/4. No entanto, os meios de cultura MS/2, MS/4, WP e B5/4 induziram calos, o que de acordo com DAVIS (1988) é uma característica indesejada durante a fase de multiplicação *in vitro* de uma espécie, porque estes podem impedir a conexão das raízes à base caulinar da plântula, prejudicando o processo de aclimação, ou até mesmo impossibilitando-o, uma vez que, geralmente, plântulas sem raízes não sobrevivem em substratos por não possuírem o órgão que as tornam capazes de absorver água e nutrientes, o que, conseqüentemente, as levaria a óbito. Por isso, como o meio de cultura B5/2 não induziu calos, fica este indicado para a multiplicação *in vitro* desta espécie vegetal medicinal, que induziu 0,93 brotos por gema, 0,83 gemas por hastes, taxa de multiplicação de 0,77, explantes com 0,20 cm de altura e também não induziram calos.

Os meios de cultura MS, B5 e WP são usados para cultura de tecidos da maioria das espécies cultivadas *in vitro*. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas que crescem sob condição *ex vitro* são conservadas nas células e tecidos cultivados *in vitro* e, por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas inteiras. Todavia, algumas alterações na composição do meio básico, como diluições, podem ser feitas para a otimização de protocolos de micropropagação (TORRES et al., 1998).

Outro fato importante que pode ser observado na Tabela 3 é que nenhum tratamento induziu raízes nos explantes, o que de acordo com NASCIMENTO

(2007), pode ter ocorrido que as raízes surgidas *in vitro* no experimento foram provenientes de fitoreguladores endógenos dos explantes utilizados e não na presença do BAP no meio de cultura. Esse dado mostra que os explantes desta espécie podem ser inoculados em meio com BAP, mas que, no entanto, após 30 dias, devem ser transferidos para outro meio de cultura que contenha auxinas para a indução de enraizamento. Dessa forma, se faz necessária a montagem de experimentos para o enraizamento *in vitro* para o Noni. Este fato também ocorreu com os estudos pioneiros de SKOOG & MILLER (1957) estabeleceram que uma alta relação citocinina:auxina promove a proliferação de brotos e suprime o desenvolvimento de raízes (estádio II da micropropagação), enquanto que uma baixa relação citocinina:auxina favorece o desenvolvimento de raízes (estádio III da micropropagação). Entretanto, algumas modificações genótipo-específicas devem ser feitas, no chamado meio básico, com a intenção de otimizar metodologias para o melhor desenvolvimento da espécie estudada (TEIXEIRA & TORRES, 1988).

Outrora, isso pode ser explicado devido às concentrações iguais dessas substâncias, em geral, propiciam a produção de calo. Além disso, um dos principais fatores que interferem na propagação *in vitro* é a suplementação do meio de cultivo com reguladores de crescimento vegetal (ASMAR et al., 2012). Contudo, em espécies consideradas difíceis de enraizar, após o tratamento com auxinas sintéticas, ocorre aumento na concentração de AIA endógeno e posteriormente decréscimo, antes da formação das raízes.

TABELA 3. Efeito de diferentes diluições dos meios basais WP, MS e B5 no desenvolvimento *in vitro* de explantes⁽¹⁾ de Noni. Coari-AM, 2012.

Meio de Cultura Basal e suas diluições	Nº de Brotos por Gema (*)	Nº de Gemas por Haste (**)	Taxa de Multiplicação (*) x (**)	Altura do Broto (cm)	Presença de Calos (%)	Presença de Raiz (%)
MS	0,53 b	0,53 bc	0,28	0,11 bc	0,00 c	0,00
MS/2	0,90 a	0,83 abc	0,75	0,29 a	26,67 a	0,00
MS/4	1,00 a	1,00 a	1,00	0,29 a	3,33 b	0,00
WP	0,77 ab	0,78 abc	0,60	0,21 ab	3,33 b	0,00
WP/2	0,90 a	0,83 abc	0,75	0,19 bc	0,00 c	0,00
WP/4	0,87 ab	0,67 bc	0,58	0,16 bc	0,00 c	0,00
B5	0,83 ab	0,74 abc	0,61	0,14 bc	0,00 c	0,00
B5/2	0,93 a	0,83 abc	0,77	0,20 abc	0,00 c	0,00
B5/4	0,67 ab	0,87 ab	0,58	0,21 ab	3,33 b	0,00

⁽¹⁾ Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

(*) x (**): Taxa de multiplicação obtida pelo do número de brotos por gema multiplicado pelo número gemas por haste (SANTOS et al., 2006).

Experimento 4: Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxinas no enraizamento de segmentos nodais de *Morinda Citrifolia* L.

Na Tabela 4 pode-se observar que não houve diferença estatística significativa para as características número de brotos por gema, número de gemas por haste, taxa de multiplicação e altura do broto para os tratamentos com 0,1; 1,0;

3,0; 5,0 mg/L⁻¹ de ANA, 1,0; 3,0; 5,0 mg/L⁻¹ de AIA e 0,1 mg/L⁻¹ de IBA. No entanto, o tratamento com 0,1 mg/L de ANA induziu a formação de calos, o que é indesejável para esta metodologia de cultura de tecidos vegetais, como já dito anteriormente. Os tratamentos com 3,0 mg/L⁻¹ de ANA, 3,0 mg/L⁻¹ de AIA e 0,1 mg/L⁻¹ de IBA não promoveram raízes. O tratamento com 5,0 mg/L⁻¹ de AIA resultou numa taxa de raízes de 10,0%, no entanto, este tratamento apresentou as piores taxas das demais características analisadas para a elaboração do protocolo de micropropagação. Já nos tratamentos com 1,0 mg/L⁻¹ de BAP e 3,0 e 5,0 mg/L⁻¹ de IBA ocorreu uma diminuição da taxa de enraizamento (3.33%), podendo qualquer um destes ser usado para o enraizamento *in vitro* de Noni, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre eles.

TABELA 4. Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxinas no enraizamento *in vitro* de explantes ⁽¹⁾ de Noni. Coari-AM, 2012.

Reguladores de Crescimento Vegetal	Nº de Brotos por Gema (*)	Nº de Gemas por Haste (**)	Taxa de Multiplicação (*) x (**)	Altura do Broto (cm)	Presença de Calos (%)	Presença de Raiz (%)
ANA (mg/L⁻¹)						
0,1	0,73 ab	0,70 ab	0,51	0,27 abc	6,67c	0,00 c
1,0	0,83 ab	0,76 abc	0,63	0,26 abcd	0,00 b	3,3 b
3,0	0,83 ab	0,80 abc	0,66	0,25 abcd	0,00 b	0,00 c
5,0	0,53 b	0,53 bc	0,28	0,87 bcd	36.67 a	0,00 c
AIA (mg/L⁻¹)						
0,1	0,76 ab	0,50 c	0,38	0,31 ab	0,00 b	3,33 b
1,0	0,50 b	0,50 c	0,25	0,20 bcd	40,0 a	0,00 c
3,0	0,90 a	0,90 ab	0,81	0,30 abc	0,00 b	0,00 c
5,0	0,50 b	0,50 c	0,25	0,11d	0,00 b	10,0 a
IBA (mg/L⁻¹)						
0,1	0,77 ab	0,97 abc	0,74	0,27 bcd	16.67 b	0,00 c
1,0	0,73 ab	0,59 bc	0,43	0,17cd	26.67 ab	0,00 c
3,0	1,00 a	1,00 a	1,00	0,35 a	0,00 c	3,33 b
5,0	0,70 ab	0,70 abc	0,49	0,12 d	43,33 a	3,33 b

⁽¹⁾ Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

(*) x (**): Taxa de multiplicação obtida pelo do número de brotos por gema multiplicado pelo número gemas por haste (SANTOS et al., 2006).

Assim, fica indicado o enraizamento desta espécie o tratamento com 1,0 mg/L⁻¹ de BAP por ser usado em menor quantidade que os demais tratamentos, sendo portanto vantajoso tanto economicamente, pois o uso de uma menor quantidade de reguladores de crescimento torna o protocolo mais barato, além de menores concentrações deste induzirem menores taxas de variação somaclonal. No entanto, como as taxas de enraizamento ainda são muito baixas, sugere-se que

novos estudos com outros reguladores de crescimento sejam realizados objetivando o aumento considerável da taxa média de enraizamento.

O enraizamento sob condições *in vitro* depende de vários fatores, entre os principais fatores relacionados ao enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, encontram-se os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz como juvenildade genótipo, dentre outros, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, as condições ambientais de crescimento das plântulas *in vitro*, dentre outros (SOUZA & PEREIRA, 2007).

As auxinas mais comumente empregadas nos meios de enraizamento *in vitro* são o ANA, IBA e AIA. E, por isso, a maior parte dos trabalhos de enraizamento *in vitro*, indicam as auxinas ANA e IBA (CARVALHO et al., 2006). NAVROSKI (2011) cita que IBA tem sido bastante usado por não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração e ser eficiente em uma grande variedade de espécies. E segundo ARIMURA et al., (2002) o ANA também foi mais eficaz na multiplicação *in vitro* das espécies gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), visto que proporcionou o aumento significativo no número de brotos e raízes. Em estudos realizados com propagação clonal *in vitro* de *Thymus vulgaris* L., conduzidos por BANDEIRA et al., (2007) demonstraram que baixas concentrações no meio de cultivo de ANA e ausência de BAP são favoráveis para a multiplicação *in vitro* de Plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), proporcionando características morfológicas e fisiológicas desejáveis para a sua comercialização, e que o sistema de micropropagação mais adequado para o desenvolvimento desta espécie, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular é em frascos vedados contendo meio MS acrescidos de 30 g/L⁻¹ de sacarose.

As auxinas promovem o enraizamento, mas nem sempre a porcentagem de enraizamento e o número de raízes formadas podem ser maximizados com o aumento na concentração de auxina (NAVROSKI, 2011).

Experimento 5: Aclimação

De acordo com a Tabela 5, a aclimação das plântulas de Noni apresentou alto índice de sobrevivência (93,33%) após 60 dias de plantio, nos substratos 100% terra e 1:1 terra:areia e, após 60 dias de aclimação, as plântulas permaneceram verdes e vigorosas. Esta planta cresceu e desenvolveu-se rapidamente nestes substratos, quando comparada com os demais tratamentos, visto que estes são semelhantes ao que esta espécie é encontra no meio ambiente. Já no substrato areia, o índice de sobrevivência foi considerado insatisfatório para aclimação de Noni durante o período de observação, uma vez que todas as plântulas mantidas neste substrato morreram antes de 30 dias, de modo que pode-se aferir que esta grande diferença de índices de sobrevivência ocorreram devido à capacidade de retenção de água no solo.

TABELA 05. Porcentagem de explantes de Noni que sobreviveram à aclimação em diferentes tipos de substratos. Coari-AM, 2012.

Tempo de Aclimação (dias)	Areia (%)	Terra (%)	Terra+Areia (%)
30	0,00	83,33	83,33

De acordo com NELSON (2005), o Noni é cultivado nos mais variados tipos de solos e sobrevive em habitats severos, caracterizados por terrenos rochosos, arenosos, solos costeiros e vulcânicos. No entanto, as plantas mais desenvolvidas e produtivas preferem solos de textura arenosa. NUNES et al., (2009) descrevem que *Morinda citrifolia* L. é uma planta que cresce tanto em florestas de solo férteis, como em áreas de baixa fertilidades, em terras arenosas e em solos pouco profundos e rochosos. Conforme descrito por NELSON & ELEVITCH (2006) é uma cultura tolerante aos efeitos salinos e alcalinos dos solos e se desenvolve tanto em regiões de clima seco como de clima úmido.

O sucesso da aclimação pode ser atribuído à associação dos seguintes fatores: uso de solo autoclavado, controle de temperatura e umidade. Esses fatores certamente facilitaram uma passagem da condição heterotrófica para autotrófica (OLIVEIRA et al., 2010). O procedimento de aclimação das plantas segundo GIRARDI & PESCADOR (2010), consiste na adaptação das plantas às condições ambientais após a remoção das condições *in vitro*, antes do transplante para local definitivo, método que por vezes acarreta baixo índice de sobrevivência das mudas em detrimento de baixa taxa fotossintética, deixando o vegetal não completamente autotrófico. Conforme SILVA et al., (2011) o substrato deve proporcionar adequado equilíbrio de umidade, aeração, consistência, nutrientes, ausência de patógenos e sementes de plantas infestantes para o bom desenvolvimento da muda. É sabido que, além do substrato, outro componente de importância é o recipiente a ser empregado para obtenção da muda (OLIVEIRA et al., 2011).

CONCLUSÃO

Assim, com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a produção de *Morinda citrifolia* L. via micropropagação é viável e o protocolo pode ser utilizado para propagar esta espécie em larga escala.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira Damião Filho, pela identificação da espécie e à Universidade Federal do Amazonas, pelo fomento.

REFERÊNCIAS

ARIMURA, C.T.; FINGER, J.B.; TEIXEIRA, J.B. Interação ANA x BAP no desenvolvimento *in vitro* de gengibre. **Acta Horticulturae (ISHS)**, n.569, p.289-91, 2002.

AKIHISA, T.; MATSUMOTO, K.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; SEINO, K.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Anti-inflammatory and Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Natural Products**, Vol. 70, No. 5, 2007.

ASMAR, S.A.; RESENDE, R.F.; ARARUNA, E.C.; MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.. Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia alba* [(Mill.)N.E.Brown]. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.14, n.esp., p.149-153, 2012.

BANDEIRA, J.M.; LIMA, C.S.M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; FALQUETO, A.R.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e

concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.472-4, 2007.

BASAR, S.; UHLENHUT, T. K.; HOGGER, P.; SCHONE, F.; WESTENDORF, J. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (noni) fruit. **Phytotherapy Research**. Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University Clinic Hamburg, Germany. Jan; v.24, n.1, p. 38-42, 2010.

CARVALHO, A.C.P.P.; TORRES, A.C; BRAGA, E.J.B.; LEMOS, E.E.P.; SOUZA, F.V.D.; PETERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de culturas de tecidos d plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 7, n.1, p. 30-60, 2011.

CARVALHO, J.M.F.; SILVA, M.M.A.S; MEDEIROS, M.J.L. Fatores Inerentes à Micropropagação., **Embrapa Algodão**, Campina Grande-PB, 28p, 2006.

CORREIA, A.A.S. **Maceração enzimática da polpa de noni (*Morinda Citrifolia* L.)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará, 2010. 105p.

DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings. **Discovery Press**: Oregon, 1988, 315 p.

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; NAGAO, E.O.; PEREIRA, J.E.S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, dez. 2009.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia*. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.11, n.3, p.292-299, 2009.

FURUASAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY, S.; JENSEN, J. Antitumor potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma 180 as cites tumour in mice. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p, 1158-1164, 2003.

GIRARDI, C.G.; PESCADOR, R. Aclimação de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.12, n.1, p.62-72, 2010.

JUNGHANS, T.G.; SOUZA, S.A. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2 ed. rev. Brasília, DF: EMBRAPA, 2013.

NACIMENTO, M.G.A. **Morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana***. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Cruz das Almas, BA: Universidade Federal Recôncavo da Bahia. 2007.42p.

NAVROSKI, M. C. **Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii Maidenii***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria. 2011. 101p.

NELSON, S.C. Noni Seed Handling and Seedling Production. Cooperative Extension Service. **College of Tropical Agriculture and Human Resources**. University of Hawaii at Manoa, 2005.

NELSON, S.C.; ELEVITCH, C.R. Workshop manual to supplement Noni: The Complete Guide for Consumers and Growers for Noni Processing, Marketing, and Field Training Workshop for YAP. **Permanent Agriculture Resources**, Honolulu, Hawaii. 2006.

NUNES, J.C.; CAVALCANTE, L.F.; REBEQUEI, A.M.; LIMA NETO, A.J.; DINIZ, A.A.; SILVA, J.J.M.; BREHM, M.A.S. **Formatação de mudas de noni sob irrigação com águas salinas e biofertilizantes no solo**. Eng. Amb., Espírito Santo do Pinhal. V.6, n.2, p. 451-463. 2009.

OLIVEIRA, T.G.O.; PINA P.S.S, BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, M.A.S. Micropropagação de *Croton antispylliticus* Mart. **Santa Maria, Cienc. Rural**, vol.41 no.10. 2010.

PAWLUS A.D.; KINGHORN D.A. Review of the ethnobotany, chemistry, biocidal activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Pharmace and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1587 – 1609. 2009.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; MCDOWELL, T. D.; HALFORD, D. A.; BREMER, B. Origin of the pantropical and nutraceutical *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae): comments on its distribution range and circumscription. **Journal of Biogeography, Stockholm**, n.37, p. 520-529, 2010.

REZENDE, J. C.; CARVALHO, C.H.S.; SANTOS, A.C.R.; PASQUAL, M.; MENDES, A.N.G. Influência de auxina e cotocinina do desenvolvimento de enbriões... **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.7, n.1, p. 1-8, 2011.

RIBEIRO, J.M.; BASTOS D.C.; MELO N.F.; OLIVEIRA E.A.G.; PINTO M.S.T. Produção de mudas micropropagadas de videira, mangueira e goiabeira/- Petrolina: **Embrapa Semiárido**, 2010.

ROCHA, H. S. Biófabrics: estrutura física e organização. In: JUNGHAS, T.G.; SOUZA, A. da S. (ed). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas, BA. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, 2009. p 121-152.

SANTOS, R.B; PAIVA, R.; NOGUEIRA.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.P.C.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D.O. Micropropagação de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v8, n.2, p. 293-296. 2006.

SILVA, D.B. ; VIEIRA, R.F.; CORDEIRO, M.C.T.; PEREIRA, E.B.C.; PEREIRA, A.V.. Propagação vegetativa de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mama-cadela) por estacas de raízes. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília-Brasil, 2011.

SILVA, P. P.; CONTIM, D.V.; ARIDE, P.H.R.; SANTOS, A.L.W.. Estabelecimento *in vitro* de ápices... **Scientia Agraria**, Curitiba, v.11, n.6, p.437-443, Nov./Dec. 2010.

SKOOG F; MILLER C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. In: Symposium of the Society for Experimental Biology, **Cambridg**, v.11. 1957. p118-131. 1957.

SOUZA , A.V.; PEREIRA M.A.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 1, 1998. 509p

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 272 p.

YANG, J.; GADI, R.; PAULINO, R.; THOMSON, T. Total phenolics, ascorbic acid, and antioxidant capacity of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder as affected by illumination during storage. **Western Pacific Tropical Research Center**, College of Natural and Applied Sciences, University of Guam, UOG Station, Mangilão, GUAM, USA, 2010.