

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**

**DISCRIMINAÇÃO DE ETNOVARIEDADES DE CUBIU (*Solanum sessiliflorum*  
DUNAL, SOLANACEAE) DA AMAZÔNIA, COM BASE EM SUAS  
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E QUÍMICAS**

**DANILO FERNANDES DA SILVA FILHO**

**MANAUS - AM  
2002**

90415

02-1218

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

DISCRIMINAÇÃO DE ETNOVARIEDADES DE CUBIU (*Solanum sessiliflorum*  
DUNAL, SOLANACEAE) DA AMAZÔNIA, COM BASE EM SUAS  
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E QUÍMICAS

BIBLIOTECA DO INPA

DANILO FERNANDES DA SILVA FILHO

Tese para doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica Econômica.

MANAUS - AM  
2002

T  
583 19046  
5586d

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

DISCRIMINAÇÃO DE ETNOVARIEDADES DE CUBIU (*Solanum sessiliflorum*  
DUNAL, SOLANACEAE) DA AMAZÔNIA. COM BASE EM SUAS  
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E QUÍMICAS

VEDADO EMPRÉSTIMO

DANILO FERNANDES DA SILVA FILHO

ORIENTADORA: MARLENE FREITAS DA SILVA

BIBLIOTECA DO INPA

Tese para doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica Econômica.

MANAUS - AM  
2002

T  
583.79046  
3586d

Silva Filho, Danilo Fernandes da

Discriminação de Etnovarietades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal, Solanaceae) da Amazônia, com base em suas Características Morfológicas e Químicas/Danilo Fernandes da Silva Filho - Manaus, 2002.

117p.

Manaus: INPA/UFAM

Tese de Doutorado

1. Botânica econômica 2. Etnovarietades de cubiu 3. Caracterização morfológica e química 4. Seleção de genótipos 5. Amazônia Central

CDD 19 ed. 583.79

**Sinopse:**

Etnovarietades de cubiu da Amazônia brasileira, peruana e colombiana foram caracterizadas e avaliadas na Estação Experimental de Hortaliças do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, em Manaus. Este material genético é componente da coleção de germoplasma do programa de melhoramento de hortaliças alternativas para o Trópico Úmido desenvolvido por pesquisadores do INPA, desde o ano de 1976.

Palavras-chave: *Solanum sessiliflorum*, Solanaceae, recurso genético, frutos comestíveis, fitoterápico, cosmético, variabilidade genética, alta produtividade.

Key Words: *Solanum Sessiliflorum*, Solanaceae, genetic resource, edible fruits, phytoterapic, cosmetic, genetic variability, high yield.

Aos meus diletos amigos e Professores: Dr. Hiroshi Noda, Dr. Warwick Estevam Kerr e "*in memoriam*" de Dr. Alejo von der Pahlen, ofereço este trabalho como forma de gratidão pelos seus ensinamentos que me ajudaram a trilhar o caminho da ciência com entusiasmo e amor.

À minha esposa Fátima, aos meus filhos Karla, Karlo, Kadia e "*in memoriam*" de Netinho, aos meus netos Rafaela, Daniela, Lucas, Avelino e Gabriel, ao meu genro Victor e à minha nora Suzana dedico com muito carinho este Trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu saúde, inteligência e entusiasmo para que eu pudesse ser útil à sociedade brasileira.

A todos os brasileiros que, com o pagamento de impostos, conseguem manter em funcionamento, as Universidades e Instituições de Pesquisas que viabilizam a capacitação de um pequeno número de privilegiados estudantes brasileiros.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e a Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade a mim oferecida para realização deste curso.

À Professora Marlene Freitas da Silva, pela segura orientação, incentivo e amizade.

Aos funcionários da Estação Experimental de Hortaliças Alejo von der Pahlen, pela colaboração prestada durante a fase de campo desta pesquisa.

Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela atenção, amizade e pelos valiosos ensinamentos.

Aos Professores Benildo Sousa Cavada e Thalles Barbosa Grangeiro, pelas orientações nas análises bioquímicas e de marcadores moleculares, realizadas nos Laboratórios de Bioquímica e de Citogenética e Genética Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Aos pesquisadores Dra. Lúcia O. K. Yuyama e ao Dr. Jaime P. L. Aguiar, pelas análises químicas do cubiu, realizadas no Laboratório de Nutrição do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Aos amigos Francisco Manoares Machado, Lúcia Martins e Maslova Carmo Oliveira pela inestimável colaboração nos trabalhos de campo e laboratório.

Ao amigo Rodrigo Maranguape pelo companheirismo e valiosa colaboração nas análises com marcadores moleculares realizadas no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Ao amigo Ronaldo de Lima Ramos pela revisão e digitação deste trabalho.

Aos colegas de curso pelo salutar convívio e companheirismo.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	21
2. OBJETIVOS .....	24
2.1. GERAL .....	24
2.2. ESPECÍFICOS .....	24
3. HIPÓTESE .....	24
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	25
4.1. ASPECTOS BOTÂNICOS .....	25
4.1.1. TAXONOMIA .....	25
4.1.1.1. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO CUBIU (Cronquist, 1981) .....	26
4.1.2. MORFOLOGIA .....	27
4.1.2.1. DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA ESPÉCIE .....	29
4.1.3. BIOLOGIA FLORAL .....	30
4.1.3.1. ABELHAS POLINIZADORAS .....	31
4.1.3.2. POLINIZADORAS EVENTUAIS .....	31
4.1.3.3. PILHADORAS .....	32
4.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS .....	32
4.3. ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA .....	34
4.4. VARIABILIDADE GENÉTICA .....	34
4.5. POPULAÇÕES E RAÇAS .....	38
4.6. ASPECTOS ECOLÓGICOS .....	40
4.6.1. CLIMA .....	40
4.6.1.1. CLIMA DA AMAZÔNIA OCIDENTAL .....	40
4.6.1.2. CLIMA EM OUTRAS ÁREAS ONDE O CUBIU É CULTIVADO .....	41

4.6.1.3. LIMITAÇÕES CLIMATICAS .....	42
4.6.1.4. ALTITUDE.....	42
4.6.2. SOLO.....	42
4.6.2.1. LATOSSOLO AMARELO.....	42
4.6.2.2. PODZÓLICOS VERMELHO AMARELO.....	43
4.6.2.3. GLEIS HUMICOS .....	43
4.7. USOS ECONÔMICOS DAS SOLANÁCEAS COMESTÍVEIS .....	44
4.8. USOS DO CUBIU .....	45
4.8.1. USO PRINCIPAL - ALIMENTÍCIO.....	45
4.8.2. USOS SECUNDÁRIOS .....	45
4.8.2.1. MEDICINAL .....	45
4.8.2.2. COSMÉTICO .....	46
4.9. FORMAS DE COMERCIALIZAÇÃO DO CUBIU.....	46
4.10. ASPÉCTOS BÁSICOS DE QUIMIOTAXONOMIA OU SISTEMÁTICA BIOQUÍMICA.....	47
4.10.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LECTINAS .....	47
4.10.2. OCORRÊNCIA E LOCALIZAÇÃO DE LECTINAS .....	48
4.10.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE LECTINAS .....	48
4.10.4. POSSÍVEIS FUNÇÕES ENDÓGENAS DAS LECTINAS VEGETAIS.....	49
4.10.5. APLICAÇÕES DE LECTINAS .....	50
4.10.6. USO DE LECTINAS COMO MARCADORES QUIMIOTAXONÔMICOS.....	51
4.11. MARCADORES MOLECULARES.....	51
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
5.1. GERMOPLASMA .....	56
5.2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL.....	57
5.3. SEMEADURA E REPICAGEM .....	58
5.4. PREPARAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL.....	58
5.5. ADUBAÇÃO MINERAL E ORGÂNICA .....	58
5.6. TRANSPLANTE E TRATOS CULTURAIS.....	58
5.7. COLHEITA .....	58
5.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	59

5.9. AVALIAÇÃO DOS CARACTERES MORFOLÓGICOS NAS ETNOVARIEDADES DE CUBIU .....	39
5.9.1. CARACTERES MORFOLÓGICOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS .....	59
5.9.1.1. CAULE .....	59
5.9.1.2. FOLHA .....	59
5.9.1.3. INFLORESÊNCIA .....	59
5.9.1.4. FLOR .....	60
5.9.1.5. FRUTO .....	60
5.10. ANÁLISES QUÍMICAS DAS SEMENTES .....	60
5.10.1. PREPARAÇÃO DE FARINHAS .....	60
5.10.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS A DIFERENTES VALORES DE PH .....	61
5.10.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS .....	61
5.10.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE .....	62
5.10.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS E 2-MERCAPTOETANOL .....	62
5.11. ANÁLISES QUÍMICAS DOS FRUTOS DE CUBIU .....	63
5.11.1 PROCESSAMENTO DOS FRUTOS PARA FINS DE ANÁLISE QUÍMICA .....	63
5.11.2. LAVAGEM DA VIDRARIA .....	64
5.11.3. UMIDADE .....	65
5.11.4. FRAÇÃO CINZA .....	65
5.11.5. PROTEÍNA .....	65
5.11.6. EXTRATO ETÉREO .....	65
5.11.7. FRAÇÃO NIFEXT .....	65
5.11.8. ENERGIA .....	65
5.11.9. DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS MINERAIS .....	65
5.12. ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA NAS ETNOVARIEDADES POR MEIO DA TÉCNICA RAPD .....	66
5.12.1. IDENTIFICAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS .....	66
5.12.2. PURIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	66
5.12.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,7% (M/V), pH 8,0 .....	67

5.12.4. REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE UTILIZANDO “PRIMERS” ARBITRÁRIOS 10-MER .....	68
5.12.5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2.0% (M/V), PH 8.0.....	69
5.13. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	70
5.13.1. ANÁLISES DE VARIÂNCIAS.....	70
5.13.2. ESTIMATIVAS DAS CORRELAÇÕES ENTRE OS CARACTERES FÍSICOS E QUÍMICOS .....	70
5.13.3. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DOS DADOS GERADOS PELA TÉCNICA RAPD .....	70
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
6.1. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS QUALITATIVAS DAS ETNOVARIEDADES DO CUBIU.....	71
6.2. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS QUANTITATIVAS DAS ETNOVARIEDADES DE CUBIU.....	76
6.2.1. DESCRITORES MORFOMÉTRICOS DOS FRUTOS DE CUBIU AVALIADOS EM 28 ETNOVARIEDADES DA AMAZÔNIA.....	76
6.2.2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR EM FRUTOS DE 28 ETNOVARIEDADES DE CUBIU.....	79
6.2.3. CONTEÚDO DE MACRO E MICROELEMENTOS DETERMINADOS EM FRUTOS DE 28 ETNOVARIEDADES DE CUBIU.....	81
6.2.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM EXTRATOS PROTÉICOS A PARTIR DE FARINHAS DE SEMENTES DE CUBIU DA AMAZÔNIA.....	85
6.3. ESTIMATIVA DOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÕES FENOTÍPICAS ( $r_F$ ), GENOTÍPICAS ( $r_G$ ) E AMBIENTAL ( $r_A$ ).....	86
6.4. VARIABILIDADE GENÉTICA DO CUBIU AVALIADA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES.....	90
6.4.1. EXTRAÇÃO DO DNA GÊNOMICO .....	90
6.4.2. REPRODUTIBILIDADE DA REAÇÃO DE RAPD.....	91
7. CONCLUSÕES .....	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Solanum sessiliflorum*. Origem e localização geográfica de 28 etnovariedades de cubiu: Brasil: 1. Benjamin Constant/AM; 2. São Paulo de Olivença/AM; 3. Barcelos/AM; 4. São Gabriel da Cachoeira/AM; 5. São Sebastião do Uatumã/AM; 6. Apuí/AM; 7. Humaitá/AM; 9. Lábrea/AM; 12. Boca do Acre/AM; 13. Santo Antônio do Içá/AM; 14. Coari/AM; 15. Barreirinha/AM; 16. Eirunepé/AM; 17. Manicoré/AM; 18. Carauari/AM; 19. Tefé/AM; 20. Borba/AM; 21. Novo Airão/AM; 22. Canutama/AM; 23. Autazes/AM; 24. Jutai/AM; 25. Ataláia do Norte/AM e 28. Codajás/AM. Colômbia: 8. Putumayo e 26. Leticia; Peru: 10. Iquitos; 11. Tarapoto e 27. Yurimagua. .... 57
- Figura 2. Esquema de extração de proteínas das farinhas de sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). .... 61
- Figura 3. Esquema do processamento dos frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) para fins de análises químicas. .... 64
- Figura 4. Detalhe do caule de uma planta de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). .... 72
- Figura 5. Detalhe da folha de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). .... 73
- Figura 6. Detalhe da inflorescência de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). .... 73
- Figura 7. Detalhe da flor de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). .... 74
- Figura 8. Variação morfológica de frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). .... 75
- Figura 9. Detalhe das sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). .... 76
- Figura 10. Perfis de RAPD em gel de agarose 2,0 % corado com brometo de etídio, obtido pela amplificação do DNA gênomico de diferentes etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum*), utilizando o primer OPF-10, evidenciando a fidelidade e repetitividade dos resultados. .... 92
- Figura 11. Perfis de RAPD em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio, obtido pela amplificação do DNA gênomico de diferentes etnovariedades de cubiu (*S.*

*sessiliflorum*), utilizando o primer OPF-06, evidenciando a fidelidade e repetitividade dos resultados. .... 93

Figura 12. Perfis de RAPD em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio, obtido pela amplificação do DNA gênomico de diferentes etnovariedades de cubiu (*S. sessiliflorum*), utilizando o primer OPF-05, evidenciando a fidelidade e repetitividade dos resultados. .... 93

Figura 13. Dendrograma de similaridades de Jaccard (1901) entre as etnovariedades do cubiu (*Solanum sessiliflorum*), obtido pelo método UPGMA, utilizando a análise de bootstrap, com 1000 repetições. Os números representam a consistência dos nós em percentagem. .... 95

Figura 14. Dendrograma de similaridades de Nei & Li (1972) entre as etnovariedades do cubiu (*Solanum sessiliflorum*), obtido pelo método UPGMA, utilizando a análise de bootstrap, com 1000 repetições. Os números representam a consistência dos nós em percentagem. .... 97

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Composição química de 100 g de polpa integral do cubiu (*Solanum sessiliflorum*) (Pahlen, 1977; Silva Filho *et al.*, 1999; Villachica, 1996; Yuyama *et al.*, 1997, Marx *et al.*, 1998). ..... 33
- Tabela 2. Composição vitamínica e mineral de 100 g de polpa integral do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) (Pahlen, 1977; Silva Filho *et al.*, 1999; Villachica, 1996; Yuyama *et al.*, 1998) e porcentagem da recomendação diária do National Research Council (1989). ..... 33
- Tabela 3. Frequência de formas dos frutos (classificação de Alcazar, 1981) em 29 progênies de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) da coleção de germoplasma do INPA, avaliada em Recife, PE (Silva Filho, 1994). ..... 35
- Tabela 4. Localização geográfica dos 30 acessos de *S. sessiliflorum* mantidos pelo INPA em Manaus em 1990 e usados para determinar se raças primitivas de cubiu existem (Silva Filho, 1998). ..... 38
- Tabela 5. Possíveis raças primitivas de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) na Amazônia Ocidental. Consulte a Tabela 4 para verificar a procedência dos acessos. .... 40
- Tabela 6. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados nas reações RAPD em etnovarietades de cubiu. .... 68
- Tabela 7. Condições térmicas utilizadas nas reações de RAPD, nas etnovarietades de cubiu (*S. sessiliflorum*). .... 69
- Tabela 8. Valores médios de caracteres morfológicos quantitativos avaliados em etnovarietades de cubiu (*S. sessiliflorum*). INPA/Manaus, 2001/2002. .... 77
- Tabela 9. Composição mínima dos frutos das diferentes etnovarietades de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). .... 80
- Tabela 10. Teores médios de macro e micro-elementos na composição química dos frutos das 28 etnovarietades de cubiu da Amazônia. Manaus/2002. .... 82

Tabela 11. Levantamento da atividade hemaglutinante em diferentes extratos protéicos de farinha de cubiu ( <i>S. sessiliflorum</i> ) da Amazônia. ....	86
Tabela 12. Estimativa dos coeficientes de correlação (r) fenotípica (F), genética (G) e ambiental (A), entre caracteres morfológicos e químicos em frutos de cubiu. Manaus, 2002. ....	88
Tabela 13. Concentração do DNA genômico de 26 etnovarietades de cubiu ( <i>S. sessiliflorum</i> ) extraído com reagente CTAB, utilizando variações na concentração de NaCl no tampão de extração e no reagente de precipitação. ....	91
Tabela 14. Tipo e número de bandas por <i>primer</i> nas reações entre 26 etnovarietades de cubiu ( <i>S. sessiliflorum</i> ).....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

A <sub>260</sub>	Absorbância a 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorbância a 280 nm
A	Adenina
RNA	Ácido ribonucleico
C	Citosina
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
CTAB	Brometo de cetiltriethylamônio
D <sub>ij</sub>	Coefficiente de Dissimilaridade genética entre i e j
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ETN	Etnovariedade
g	Grama
G	Guanina
Ha	Hectare
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Kb	kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
m	Metro
Mg	Miligrama

MM	Milimolar
Ng	Nanograma
NaCl	Cloreto de Sódio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
Pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogenionico
RAPD	Amplificação Randômica de DNA Polimórfico
S <sub>ij</sub>	Coefficiente de Similaridade Genética entre i e j
T	Timina
Taq DNA polimerase	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris-Ácido bórico 45mM, EDTA 1mM, pH 8,0
Tris	Tris-hidróxiaminometano
µg	Micrograma

## RESUMO

O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é um dos mais importantes recursos genéticos nativos da Amazônia que foi totalmente domesticado pelos índios sul-americanos. Com o objetivo de determinar caracteres qualitativos e quantitativos, para discriminar as etnovariedades (ETNs), facilitar sua conservação *in situ* e *ex situ*, e o seu melhoramento, foram caracterizadas e avaliadas 28 ETNs do Banco de Germoplasma do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, procedentes de diferentes locais da Amazônia brasileira, peruana e colombiana. O experimento foi realizado na Estação Experimental de Hortaliças "Alejo von der Pahlen" localizada no km 14 da AM 010, em Manaus. O solo dessa área é do tipo Podzólico Vermelho-Amarelo, álico, de textura arenosa, de baixa fertilidade natural. Cada planta foi adubada com 2kg de composto orgânico, 30g de superfosfato triplo, 30g de cloreto de potássio e 10g de ureia. Adotou-se o delineamento experimental de blocos casualizados com 28 tratamentos (as ETNs) com quatro repetições. A unidade experimental foi constituída de uma área de 7,5m<sup>2</sup> contendo cinco plantas úteis. Foram avaliados caracteres qualitativos e quantitativos dos aparelhos vegetativo e reprodutivo das plantas. Os caracteres qualitativos observados foram do caule, da folha, da flor, da inflorescência e do fruto : nas folhas, caracterizou-se a variabilidade genética por meio de marcadores moleculares, utilizando-se a técnica RAPD; nos frutos foram avaliados os seguintes caracteres quantitativos, físicos e químicos: número médio de frutos (NMF), comprimento do fruto (CF), largura do fruto (LF), espessura da polpa (EP), número de lóculos (NL), quantidade de suco contido na cavidade locular (QS), peso médio do fruto (PMF), peso da casca (PC), peso da semente úmida (PS) e peso estimado de frutos por planta (PEF), umidade (UMI), fração cinza (FC), proteína (PRO), extrato etéreo (ET), fração nifext (FN), energia (ENE), potássio (K), zinco (Zn), manganês (Mn), sódio (Na), ferro (Fe), magnésio (Mg) e Cálcio. Os dados gerados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANAVA), estimativa dos coeficientes de correlações fenotípica, genética e ambiental, e análise de agrupamento, gerados pela técnica RAPD, com função de análise de "bootstrap", para promover a sustentabilidade do dendrograma encontrado, utilizando-se os coeficientes de Nei e Li e de Jaccard. As ANAVAs detectaram diferenças significativas para todos os caracteres avaliados. Dos órgãos estudados nas plantas das 28 ETNs, os caracteres

relacionados aos frutos é a que evidencia maior variabilidade genética. Foram encontradas nove diferentes formas de frutos, com maior predominância de frutos globosos, variando em comprimento de 3,1cm a 9,2cm, na largura diâmetro de 3,3cm a 7,7cm, em espessura da polpa de 1,5mm à 19,5mm e em peso, de 18,5 a 301g. Na análise da composição centesimal dos frutos das 28 ETNS de cubiu observou-se que os teores de carboidratos e de lipídeos varia entre 1,3% a 27,2% e 58,5% e 87,3%, caracterizando o cubiu como um alimento de baixo valor calórico. A análise do conteúdo de macro e microelementos do cubiu revelou que o potássio (variando de 54,6mg a 463,5mg) e o ferro (de 97,3µg a 352,0µg) foram os elementos que ocorreram em maior concentração no material estudado. Quanto à atividade hemaglutinante, nenhum dos extratos protéicos obtidos à diferentes valores de pH (2,6; 7,6; e 9,0) a partir da farinhas das sementes das 28 ETNs do cubiu, apresentou atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho e humanas do sistema ABO, mesmo quando as mesmas foram tratadas com enzimas proteolíticas. A combinação entre os pares de caracteres morfológicos EP, PMF, CF, PS, PC e QS, permite selecionar genótipos para o melhoramento do cubiu. O menor e maior valor de coeficiente de correlação genética observado foi, respectivamente, entre CF e PS ( $r_G = 0,600^{**}$ ) e LF e QS ( $r_G = 0,962^{**}$ ). Entre os componentes químicos mais importantes, a PRO, o Fe, o Mg, e o Ca apresentam fortes correlações genéticas entre si. Pelos coeficientes de correlação genética encontrados entre PRO e Fe, PRO e Mg, e PRO e Ca ( $r_G = 0,786^{**}$ ,  $r_G = 0,754$  e  $0,768^{**}$ , respectivamente) parece-nos factível selecionar, simultaneamente, outros elementos que contribuirão para o melhoramento do cubiu, para fins alimentícios. De modo geral, por meio da combinação entre caracteres morfológicos e químicos, é possível selecionar genótipos importantes para o melhoramento do cubiu. O DNA genômico extraído apresentou vários fragmentos de aproximadamente 23 kb sem degradação aparente e livre de contaminação por RNA. Todas as amostras apresentaram graus de pureza satisfatórios quando mensurados pela relação  $A_{260}/A_{280}$ . Os valores da razão obtidos com as diferentes amostras do cubiu variaram de 1,85 a 2,28 indicando que o DNA purificado possuía pequena contaminação com proteínas e que, a metodologia pode ser considerada eficiente e adequada para as análises genéticas propostas. Com relação à reprodutibilidade da reação de RAPD, todas as reações realizadas, apresentaram bandas definidas de alta fidelidade e repetitividade. Dos sete *primers* utilizados, apenas um não foi capaz de detectar

polimorfismo no DNA das amostras estudadas. Dos 59 fragmentos detectados pelos *primers* utilizados, 28 são polimórficos. Os coeficientes de similaridade calculados pelo modelo matemático de Nei & Li, a partir dos dados binários, tiveram uma variação de 0,819 entre a ETN 1 e ETN 16, originárias de Benjamin Constant e Eirunepé (AM), respectivamente; 0,988 a ETN 3 e ETN 25, ambas originárias de Barcelos e Atalaia do Norte (AM)), enquanto os coeficientes de similaridades calculados a partir do modelo de Jaccard tiveram a variação de 0,694 entre a ETN 1 e ETN 16 e 0,976 entre ETN 3 e ETN 25. No dendrograma das ETNs baseado nas similaridades de Jaccard e de Nei & Li, observou-se uma estrutura semelhante, para os três diferentes grupos: o Grupo I formado por uma única etnovariabilidade de Benjamin Constant, com distância genética entre 0,819 a 0,988 e consistência de 100%; o Grupo II, reunindo (69,2% das ETNs) o material genético procedente da Amazônia Ocidental; e o Grupo III, que pareceu-nos mais consistente, reunindo 26,9% das etnovariabilidades, com exceção da ETN procedente de Atalaia do Norte(AM), representando muito bem o grupamento das ETNs, dentro da Amazônia Central. Pelos grupamentos que foram formados, pelo menos seis ETNs poderão ser selecionadas para aproveitamento como progenitores em programa de melhoramento do cubiu: a ETN 1 de Benjamin Constant (AM) (distância de 0,981 e consistência de 100%); a ETN 8 de Putumayo (Colômbia) (distância de 0,947 e consistência de 45%); a ETN 18 de Caruari (AM) (0,965 de distância e consistência de 34%); a ETN 4 de São Gabriel da Cachoeira (AM) (0,974 de distância e 34% de consistência); a ETN 7 de Humaitá (AM) (0,945 de distância e 38% de consistência); e a ETN 23 de Autazes (AM) (0,945 de distância e 17% de consistência). A hipótese de que as ETNs de cubiu poderia ser discriminada por meio de suas características qualitativas e quantitativas morfológicas, químicas e por marcadores moleculares foi confirmada.

Palavras-chave: *Solanum sessiliflorum*, Solanaceae, recurso genético, frutos comestíveis, fitoterápico, cosmético, variabilidade genética, alta produtividade.

## ABSTRACT

The cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) is one of the most important native genetic resources of Amazonia which was totally domesticated by South American Indians. To determine qualitative and quantitative characters, discriminate ethnovarieties (ETNs), facilitate *in situ* and *ex situ* conservation and crop improvement, 28 ETNs from the Germplasm Bank of the National Research Institute for Amazonia - INPA, from various parts of Brazilian, Peruvian and Columbian Amazonia were characterized and evaluated. The field trial was carried out at the "Alejo von der Pahlen" Horticulture Experiment Station, km 14 of the AM 010 highway, Manaus, Amazonas, Brazil. The soil is a Red-Yellow Ultisol, Alic, with sandy texture and low natural fertility. The plants were fertilized with 2 kg of organic compost, 30 g of triple superphosphate, 30 g of potassium chloride and 10 g of urea. The experimental design used randomized blocks with 28 treatments (the ETNs) and four repetitions of 7.5 m<sup>2</sup> with five measure plants. Qualitative and quantitative characters of the plant vegetative and reproductive organs were evaluated. The qualitative characters were observed on the stem, leaf, flower, inflorescence and fruit; DNA was extracted from the leaves and RAPD markers were used to detect variation; quantitative physical fruit characters included average number of fruits (ANF), fruit length (FL), fruit width (FW), pulp thickness (PT), number of locules (NL), amount of juice in the locular cavity (AJ), average fruit weight (AFW), rind weight (RW), humid seed weight (WS) and average weight of fruits per plant (WAF); fruit pulp was chemically analyzed for humidity (HUMI), ash (A), protein (PRO), ether extract (ET), nitrogen free fraction (NF), energy (ENE), potassium (K), zinc (Zn), manganese (Mn), sodium (Na), iron (Fe), magnesium (Mg) and calcium (Ca). The morphometric data were analyzed with analysis of variance (ANOVA), coefficients of phenotypic, genetic and environmental correlations were estimated, and the binary RAPD matrix was used to generate Nei & Li and Jaccard similarity coefficients, which were used to group the ETNs with UPGMA, using a 1000 repetition "bootstrap" to evaluate the consistency of the dendrogram. The ANOVAs detected significant differences among ETHs for all morphometric characters, with fruit shape showing the greatest phenotypic divergence among the 28 ETNs. Among these ETNs nine different fruit shapes were found, with a predominance of spherical fruits, varying in length

from 3.1 to 9.2 cm, in diameter from 3.3 to 7.7 cm, in pulp thickness from 1.5 to 19.5 mm and in weight from 18.5 to 301 g. The ether extract and N-free extract fractions varied from 1.3 and 27.2 % fresh weight and 58.5 and 87.3 % f.w., respectively, characterizing cubiu as a low energy food 71,3 to 87,3Kcal. The potassium content varied from 54.6 to 463.5 mg and iron varied from 97.3 to 352.0 mg, and were the minerals with the highest concentrations. None of protein extracts, obtained at different pHs (2.6; 7.6; 9.0) from seed flour, presented hemagglutinate activity against rabbit blood and the human ABO system, even when treated with proteolytic enzymes. The combination between pairs of morphologic characters EP, PMF, CF, PS, PC and QS allows genotype selection for cubiu improvement. The smallest and largest values of the genetic correlation coefficients were, respectively, between CF and PS ( $r_G = 0.600^{**}$ ), and LF and QS ( $r_G = 0.962^{**}$ ). Among the more important chemical components, strong genetic correlations were found among PRO, Fe, Mg and Ca: PRO and Fe ( $r_G = 0.786^{**}$ ), PRO and Mg ( $r_G = 0.754^{**}$ ), and PRO and Ca ( $r_G = 0.768^{**}$ ), suggesting the feasibility of selecting simultaneously for other elements that will contribute for cubiu improvement as a nutritious food. In general, using a combination of morphologic and chemical characters, it will be possible to select elite genotypes for cubiu improvement. The genomic DNA extracted yielded various 23 kb fragments without apparent degradation and free of RNA contamination. All the samples presented satisfactory degrees of pureness when measured by the relation  $A_{260}/A_{280}$ , varying from 1.85 to 2.28, and indicating that the purified DNA was only slightly contaminated with proteins and that the methodology can be considered efficient and adequate for the proposed genetic analyses. The reproducibility of the RAPD reaction was high in all repetitions and presented definite bands of high fidelity. Of the seven primers used, only one of them did not detect polymorphism. Of the 59 fragments detected, 28 are polymorphic. The Nei & Li similarity coefficients varied from 0.819 between ETN 1 and ETN 16, which originated in Benjamin Constant and Eirunepé (AM), respectively, to 0.988 between ETN 3 and ETN 25, which originated in Barcelos and Atalaia do Norte (AM). The Jaccard similarity coefficients varied from 0.694 between ETN 1 and ETN 16, and 0.976 between ETN 3 and ETN 25. In the dendrograms of the ETNs based on the similarities of Jaccard and Nei & Li presented very similar structures, with good internal consistency, and with three groups: Group I was formed by a single ethnovariety from Benjamin Constant, with genetic distance between it

and the next group of 0.819; Group II grouped 69.2 % of the ETNs originating from Amazonia Occidental; and Group III joined 26.9 % of the ETNs in Central Amazonia, with a single ETN originating in Atalaia do Norte (AM). Based on these groupings, at least six extremely divergent ETNs could be selected for exploitation as parents in cubiu improvement programs with a good probability of generating hybrid vigor: ETN 1 from Benjamin Constant (AM); ETN 8 from Putumayo (Colombia); ETN 18 from Carauari (AM); ETN 4 from São Gabriel da Cachoeira (AM); ETN 7 from Humaitá (AM); and ETN 23 from Autazes (AM). The hypothesis that ethnovarieties of cubiu in Amazonia can be discriminated with qualitative, quantitative morphological and chemical descriptors, and molecular markers was confirmed.

**Key Words:** *Solanum Sessiliflorum*, Solanaceae, genetic resource, edible fruits, phytoterapic, cosmetic, genetic variability, high yield.

# 1. INTRODUÇÃO

Entre os recursos genéticos nativos da Amazônia, o cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é uma espécie anual que foi completamente domesticada pelos povos indígenas da região antes da chegada dos europeus (Schultes, 1984). Esta Solanaceae arbustiva é nativa do Alto Orinoco, na bacia Amazônica, onde foi previamente cultivada pelos indígenas levando em consideração, a qualidade de seus frutos comestíveis (Silva Filho, 1998).

Hoje, o cubiu está adaptado tanto aos sistemas agrícolas tradicionais da Amazônia, como aos sistemas agrícolas modernos (monocultivos de altos insumos destinados aos mercados regionais, nacionais e internacionais). O seu cultivo é feito em quintais, jardins, pomares e roças de índios e caboclos da Amazônia, e tem sido levado à outras regiões brasileiras e daí, para outras partes do mundo (Silva Filho *et al.*, 1997).

Sob o ponto de vista econômico, o cubiu tem se constituído numa importante matéria-prima para agroindústria moderna, por reunir muitas características procuradas pelos mercados nacionais e internacionais: a planta é rústica e de fácil cultivo, muito produtiva, dependendo do genótipo cultivado, podendo produzir 100 toneladas de frutos por hectare. O fruto é exótico, de sabor característico e agradável, e pode ser utilizado de múltiplas formas (sucos, doces, geléias, compotas, molhos para temperar carnes de um modo geral, cosméticos e medicamentos caseiros para controlar os altos níveis de colesterol, ácido úrico e açúcar no sangue). Além do mais, já existem conhecimentos sobre algumas de suas características químicas e tecnológicas que permitem sua industrialização em maior escala. Por ser anual e bem adaptado aos solos das várzeas da Amazônia, é possível produzir frutos com pouco ou nenhum insumo, permitindo sua comercialização por preços bem acessíveis (Silva Filho, 1998).

No Brasil, o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) mantém um Banco de Germoplasma, com 121 acessos coletados na Amazônia brasileira, peruana e colombiana, de populações que se encontram em diversos estágios de domesticação e que ao longo de 26 anos vêm servindo de base genética para o processo de melhoramento da espécie no estado do Amazonas.

Nas últimas décadas este material genético foi muito estudado. Entre os trabalhos científicos mais importantes, desenvolvidos na Amazônia brasileira e peruana constam os de Pahlen (1977), Salick (1987), Silva Filho *et. al.* (1993). Atualmente, o mais completo trabalho encontrado na literatura internacional é um manual técnico publicado por Silva Filho (1998), onde está descritos o cultivo, melhoramento, industrialização, com muita ênfase à conservação da espécie.

Por outro lado, não basta somente a preocupação de se conservar germoplasma, há, também, a necessidade prioritária de estudos para caracterizar as variações morfológicas e a composição química, que permita melhorar o conhecimento da biologia da espécie e da constituição genética de suas etnovariedades, para serem exploradas em prol da melhoria de vida dos pequenos agricultores que mantêm o material genético em suas propriedades, mas desconhecem a potencialidade que porventura pode estar presente nas plantas e não foram identificadas (Silva Filho *et al.*, 1997). Portanto, a caracterização de populações, tanto fenotípica quanto genotípica, é muito importante para se conhecer sua estrutura genética e avaliar aquelas características que estejam ligadas ao processo produtivo (Frankel, 1989).

Em qualquer trabalho com recursos genéticos, seja para conservação ou melhoramento, a caracterização morfométrica das coleções é a base para outros estudos. Dessa forma, a morfologia fornece a base mais importante para comparação dos organismos vegetais, sobretudo em relação às plantas vasculares. Ela promove não somente a comparação da estrutura geral, mas também da estrutura dos diferentes órgãos vegetativos e de reprodução, principalmente, das flores e inflorescências das Angiospermas. Por isso, é que somente a morfologia comparada oferece a possibilidade de identificar os elementos estruturais homólogos aos quais se deve comparar as estruturas orgânicas, para determinar parentescos formais autênticos (Radford, 1986).

Entre os diversos tipos de moléculas biologicamente ativas que o Reino Vegetal apresenta, as proteínas, particularmente aquelas que interagem reversivelmente com carboidratos, tem se constituído num foco constante e crescente de pesquisa no mundo inteiro, principalmente pela grande variabilidade de aplicações biológicas destas moléculas. Para se ter uma idéia, atualmente estas moléculas, chamadas genericamente de **lectinas** (do

latim *legere*, que significa escolher), têm sido consideradas como insumos básicos em biotecnologia (Moreira *et al.*, 1991; Cavada *et al.*, 1996), pois desempenham funções no crescimento e alongamento da parede celular vegetal e animal, bem como possuem ação seletiva para a estimulação mitótica de callus e protoplastos, atuando no transporte e armazenamento de carboidratos (Bowles & Kaus, 1976).

Entre as muitas aplicações encontradas para estas proteínas existem exemplos de seu uso como marcadores quimiotaxonômicos, como é o caso de lectinas de leguminosas das tribos *Viceae* (Rougé *et al.*, 1987) e *Phaseoleae* (subtribo *Diocleinae*) (Oliveira *et al.*, 1990; Moreira *et al.*, 1993; 1995). É evidente, portanto, que a tentativa de se estabelecer correlações quimiotaxonômicas entre espécies relacionadas ou mesmo entre populações de uma mesma espécie como é o caso do cubiu, por meio de parâmetros bioquímicos, pode ser extremamente útil para melhor separar e classificar as etnovarietades de cubiu da Amazônia e buscar fontes potenciais de moléculas biologicamente ativas que possam contribuir na cura de muitas doenças (entre as mais importantes destaca-se o câncer) que dizimam um grande número de pessoas no mundo global.

Atualmente, o uso de marcadores moleculares é uma ferramenta complementar para caracterizar germoplasma, tanto por oferecer marcadores que podem apoiar a seleção (Stuber, 1992), obtenção de "fingerprints" de cultivares (Deng *et al.*, 1995), estudos de relações filogenéticas entre espécies e gêneros (Federici *et al.*, 1988), construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e na localização de genes de interesse econômico (Simone *et al.*, 1990).

Os RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) são os marcadores moleculares mais usados em estudos genéticos. Eles são detectados pela amplificação, de forma arbitrária, de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos pela reação de polimerase em cadeia (PCR), na presença da enzima termoestável "DNA polimerase (Williams *et al.*, 1990).

Por se tratar de uma técnica de fácil execução, rápida obtenção de marcadores, necessidade de pequenas quantidades de DNA genômico (10 a 100 ng), custo relativamente baixo, espera-se que o estudo consiga discriminar de forma satisfatória estas etnovarietades

de cubiu, para que no futuro sejam aproveitadas em programa de melhoramento da espécie, e utilizadas de forma econômica pela população da Amazônia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAL**

Determinar caracteres qualitativos e quantitativos importantes para discriminar etnovariedades de cubiu e facilitar sua conservação *in situ* e *ex situ* e o seu melhoramento.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

- a) Caracterizar qualitativa e quantitativamente os descritores morfológicos das etnovariedades de cubiu;
- b) Isolar e caracterizar lectinas e outros componentes químicos das etnovariedades de cubiu;
- c) Estabelecer correlações quimiotaxonômicas e morfométricas entre as etnovariedades de cubiu; e
- d) Avaliar a variabilidade genética das etnovariedades por meio de marcadores moleculares com a técnica de RAPD.

## **3. HIPÓTESE**

As comunidades rurais indígenas e caboclas da Amazônia possuem grande diversidade genética vegetal, nativa e exótica, em diferentes ecossistemas ao redor de suas habitações que recebem várias formas de manejo. A ampla distribuição do cubiu desde o período pré-Colombiano e a intensidade de manejo nesses diferentes ambientes, resultaram no surgimento de etnovariedades que podem ser discriminadas.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. ASPECTOS BOTÂNICOS

#### 4.1.1. TAXONOMIA

A família Solanaceae está largamente distribuída nas regiões tropicais e temperadas do mundo. É uma família cosmopolita com centro de distribuição, particularmente, na Austrália, na América Central e América do Sul, onde cerca de 40 gêneros são endêmicos. A família abrange mais de 90 gêneros e contém cerca de 2000-3000 espécies divididas por (Heywood, 1978) em cinco tribos: Nicandreae, Solanae, Datureae, Cestareae e Salpiglossideae. As três primeiras apresentam embriões curvos e, nas duas restantes os embriões são retos ou ligeiramente recurvados.

Estudos realizados para facilitar e reorganizar a estrutura taxonômica do gênero *Solanum*, já que no passado, muitos *taxa* foram formalmente reconhecidos, resultando em um considerável número de nomes, levaram D'Arcy (1973) a propor para o gênero e seus grupos constituintes (subgêneros), uma subdivisão do gênero em 52 seções. Nesta extensa classificação, a seção *Lasiocarpum* (Dun.) D'Arcy, do subgênero *Leptostemonum* (Dun.) Bitt., conforme concebido por D'Arcy (l.c.), consiste de 13 espécies, a maioria com distribuição nos Andes e na parte ocidental da bacia amazônica, na América do Sul.

As espécies, de hábito em geral muito variado têm, mais freqüentemente hábito herbáceo, ou são arbustos sublenhosos, árvores pequenas ou arvoretas, árvores grandes e até lianas. todas particularmente abundantes na América tropical, porém, muito bem representadas nas regiões temperadas (Heywood, 1978).

As relações filogenéticas e a moderna distribuição das espécies da Seção *Lasiocarpum* sugerem uma recente migração do grupo para as terras baixas da Amazônia ocidental, seguindo também, em direção às regiões montanhosas dos Andes, Colômbia e Venezuela. O *habitat* natural da família vai desde as savanas às florestas altas ou de altitude, embora muitas espécies sejam bem sucedidas em áreas perturbadas (Whalen *et al.*, 1981).

Algumas espécies são amplamente cultivadas por seus frutos comestíveis e outras são potencialmente importantes como fonte de germoplasmas. A associação dessas espécies com

o homem tem influenciado a formação de raças e a evolução em alguns *taxa* (Whalen *et al.*, 1981).

As afirmações de Whalen *et al.* (1981) indicam que todos os membros da seção *Lasiocarpum* são sexualmente reprodutivos, autocompatíveis e diplóides. Barreiras internas para hibridização entre espécies são geralmente muito bem desenvolvidas e nelas estão incluídas a incompatibilidade estilar, sementes híbridas por aborto e esterilidade parcial híbrida.

#### 4.1.1.1. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO CUBIU (Cronquist, 1981).

<b>Reino:</b>	Vegetal
<b>Divisão:</b>	Magnoliophyta
<b>Subdivisão:</b>	Magnoliophytina
<b>Classe:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclasse:</b>	Asteridae
<b>Ordem:</b>	Solanales
<b>Família:</b>	Solanaceae
<b>Gênero:</b>	Solanum

Nomes populares: Brasil: Cubiu, tomate de índio e maná (Silva Filho, 1998). Colômbia: be-ta-ka (kubeo), cocona, de-twá (Taiwano, Tatuya), lulo, tupiro, topiro, coconilla, lulo. Peru: cocona, tupiro, topiro, kukush (Deptº de Amazonas). Venezuela: Pupú (Arecuna), tupiro (Whalen *et al.*, 1981). USA: Orinoco apple e peach tomato (Salick, 1987).

Schultes e Romero-Castañeda (1962) notaram a presença de muitos cultivares na Amazônia colombiana e reconheceram que dois deles eram suficientemente distintos de *Solanum sessiliflorum* e propuseram para eles os nomes: *S. alabile* e *S. georgicum*.

Em *S. alabile* do rio Putumayo, na Colômbia, os frutos são grandes, globosos, 10 cm de diâmetro ou mais, mais doces e menos ácidos que as outras formas de *S. sessiliflorum*. Muitos autores porém, questionaram o status de espécie para *S. alabile* e, de acordo com Whalen *et al.* (1981), a forma do fruto não parece ser um caráter suficientemente distinto de outras cultivares com bagas similares, o que ocorre esporadicamente em *S. sessiliflorum*.

A forma *S. georgicum* denominada por Schultes e Romero Castañeda (1962) e considerada por Whalen *et al.* (l.c.), como var. *georgicum*, é de grande interesse segundo os autores, como possível progenitora dos cultivares de *S. sessiliflorum*. O caule e as folhas desta variedade são espinhosos, as bagas globosas e relativamente pequenas, caracteres estes que parecem ser do ancestral em *S. sessiliflorum*. A perda dos espinhos e o aumento no tamanho e variabilidade dos frutos poderiam ser resultantes da seleção humana durante os processos de domesticação. Nenhum outro caráter distingue a var. *georgicum* da var. *sessiliflorum*.

#### **Chave para a separação das variedades de *S. sessiliflorum***

1. Plantas desarmadas ou sem espinhos; frutos ovóides ou menos freqüentemente globosos.....var. *sessiliflorum*
2. Plantas com espinhos; frutos globosos... .....var. *georgicum*

#### ***Solanum sessiliflorum* Dunal var. *sessiliflorum***

Arbustos desarmados; frutos muito variáveis na forma e no tamanho, ovóides a fracamente piriformes ou globosos, 4 – 9 cm de diâmetro, freqüentemente 6-loculares.

#### ***Solanum sessiliflorum* Dunal var. *georgicum***

Arbustos com espinhos, caule alargado na base, lateralmente comprimido com espinhos; pecíolos e nervuras maiores das folhas com espinhos em ambas as faces; espinhos 4-10mm de comprimento, 1-4mm de largura na base, usualmente espaçados, aproximadamente iguais em tamanho; bagas globosas, 3 – 4 cm de diâmetro, 4-loculares.

### **4.1.2. MORFOLOGIA**

A morfologia fornece a base mais importante para a comparação dos organismos vegetais, sobretudo em relação às plantas vasculares. Ela promove não somente a comparação da estrutura geral, mas também da estrutura dos diferentes órgãos vegetativos e de reprodução, principalmente, das flores e inflorescências das Angiospermas. Somente a morfologia comparada oferece a possibilidade de identificar os elementos homólogos aos

quais se deve comparar as estruturas orgânicas, para determinar parentescos formais autênticos. Com isso, tem-se conseguido uma base de comparação para julgar as diferenças e as semelhanças somente após constatar quais as partes das diferentes plantas correspondem entre si. Comparando-se apenas as flores de uma Poligalácea (*Plygala*) com as das Papilionáceas foram avaliados os erros a que poderiam levar as semelhanças externas (Radford 1986).

Evidências morfológicas constituem a linguagem básica para a caracterização, identificação e das relações entre as plantas. As características morfológicas são facilmente observáveis e muito freqüentemente usadas nos estudos taxonômicos.

Além da análise da estrutura geral, também é missão da morfologia desvendar o conjunto de caracteres que determina o que normalmente se descreve como hábito ou aspecto externo da planta. Neste sentido, ainda não se esgotaram as possibilidades de conhecer as relações e diferenças formais por meio de pesquisas cada vez mais cuidadosas. O mais importante é considerar o modo de desenvolvimento dos diversos órgãos, assim como o ciclo de desenvolvimento dos diversos órgãos, e o de toda a planta (Radford, 1986).

Naturalmente, tais pesquisas esntendem-se, também, à anatomia de todos os órgãos, onde numerosas estruturas são características para estirpes mais ou menos grandes. Neste contexto podem ser incluídas: a estrutura e ordenação dos tecidos condutores e a estrutura histológica do xilema secundário das espermatófitas; a estrutura das folhas; a presença de tubos lactíferos articulados (*Compositae/Asteraceae*) ou contínuos (*Euhporbiaceae*); a presença de cistóitos (*Urticales*) e a formação de diversos tipos de pêlos, como os pêlos unicelulares das *Crucíferas*, às vezes encontrados em outros grupos (Radford, 1986).

É importante realçar que muito outros estudos podem fornecer dados importantes como a Embriologia, a Palinologia, a Fitotaxonomia para determinação das chamadas substâncias secundária ou seja, a comprovação de certos alcalóides ou a presença de pigmentos florais característicos como as betacianas, exclusivas das *centrospermas*. Também, o isolamento geográfico representa um fator importante no aparecimento e posterior desenvolvimento de novas estirpes. A fitogeografia é, logicamente, essencial para

esclarecer relações de parentesco, determinando as áreas de distribuição geográfica (Weberling & Schwantes, 1989).

#### 4.1.2.1. DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA ESPÉCIE

*Solanum sessiliflorum* Dunal, é um arbusto de 2 m de altura, ereto, bastante ramificado, caule geralmente tomentoso, raramente com espinhos; pêlos estrelados aparentemente sésseis, mas com pequeno pedicelo de 0,1 mm de comprimento, alguns deles com pedicelos maiores de 0,3 mm; raios laterais 5 – 9, 0,3 – 0,6 mm de comprimento. Folhas grandes, lâminas 25 – 45 cm de comprimento, largamente ovais, repandas, truncadas e em geral assimétricas na base com 5 – 7 veias laterais maiores em face; superfície adaxial esparsamente ou densamente serícea, os pêlos estrelados aparentemente sésseis, com o ponto central elengado e os raios laterais poucos ou ausentes, 0,05 – 0,2 mm de comprimento; as veias maiores densamente recobertas com pelos estrelados, como ponto central muito curto e os raios laterais bem desenvolvidos; face abaxial das folhas densamente cinéreo-pubescente com pelos estrelados curto pedicelados; pecíolos relativamente mais curtos do que as lâminas das folhas, estrelado pubescentes. Inflorescência com 66 – 16 flores, as mais inferiores (2 – 5), perfeitas, as demais femininas estéreis, curto-pediceladas, pedicelos 2 – 7 mm de comprimento; cálice largamente campanulado, 2 – 3,5 mm de comprimento, 5 – 8 mm de largura, externamente estrelado-pubescente; lobos do cálice ovais a largamente ovais, agudos no ápice, cada um deles com a nervura mediana, proeminente; corola branca ou esverdeada, 1,8 – 2,8 cm de diâmetro, dividida até quase à base em 5 lobos ovais ou ovados lanceolados, externamente pubescentes; anteras 5, poricidas, lanceoladas a linear-lanceoladas, atenuadas, mais ou menos coniventes, 6,5 – 9,5 mm de comprimento, em geral, ligeiramente curvadas no ápice; um par superior de anteras mais longas que as três inferiores; estilete glabro, 8 – 11 mm de comprimento nas flores perfeitas, um pouco reduzidos ou ausentes nas flores estaminadas. Fruto baga ou solanideo, 1 - 3 por inflorescência, globosa ou ovóide, 2,5 – 9,5 cm de diâmetro, 4,6-locular, primeiramente densamente estrelado-pubescente, pêlos decíduos, ficando as bagas, na maturação, glabras, vermelho-alaranjadas, vermelho-vivo ou raramente amarelas, quando maduras. Sementes numerosas, amarelas, lenticulares largamente ovadas a reniformes, 3,2 – 4,0 mm de comprimento, as faces minutamente foveoladas ou quase lisas; as margens

espassadas. Germinação fanerocotiledonar, cotilédones ovóides, inteiros, peninérveos, longo-peciolados. Eófilos alternos sem estípulas.

#### 4.1.3. BIOLOGIA FLORAL

A biologia floral de muitas Solanáceas é bem conhecida (Todd, 1882; Harris & Kucks, 1902; Linsley & Cazier, 1963; Bowers, 1975; Buchman *et al.*, 1977; Schilling *et. al.*, 1979). Muitas espécies ornamentais dependem de insetos para sua polinização (Overland, 1960). Os detalhes da biologia floral do cubiu são menos conhecidos, e são importantes para garantir a sua produção e apoiar os trabalhos de melhoramento.

A floração do cubiu inicia aos 4 ou 5 meses após a germinação. As flores abrem por volta das 07:00 h e começam a fechar às 16:00 h. Quando abrem, as anteras já estão deiscentes e os estigmas, de um modo geral, receptivos. As flores duram apenas dois dias e, se não houver fertilização, murcham e caem.

O cubiu é considerado uma espécie andromonóica (Paytan, 1997). No gênero *Solanum*, plantas verdadeiramente monóicas ou dióicas não são conhecidas, visto que flores unicamente femininas não foram observadas até o presente momento (Symon, 1979). Mesmo assim, Pahlen (1977) considerou o cubiu uma planta que se auto-fecunda, pelo fato de que as plantas isoladas apresentavam boa produção de frutos, mas não descartava a ocorrência de uma determinada taxa de cruzamentos naturais, face a presença de abelhas sociais e solitárias visitando e carregando pólen. Silva Filho *et al.* (1993) estudaram a relação da variância entre plantas dentro das parcelas e a variância genética ( $\sigma_d^2 / \sigma_g^2$ ) em vários caracteres em cubiu e observaram que o cubiu é uma espécie predominantemente autógena, pois os valores estimados da relação foram abaixo de 1,06 para todos os caracteres, apoiando as observações de Pahlen (1977). Entretanto, estudos da biologia floral do cubiu levaram Storti (1988) a considerar essa espécie como alógama, porque seus experimentos de autopolinização e de polinização cruzada controlada resultaram numa taxa nula de autopolinização ou muito baixa de polinização cruzada, com pegamento de frutos. Salick (1989) demonstrou que o cubiu tem uma forte predominância do progenitor feminino, ou seja, de herança materna nas características do fruto. O cruzamento de flores femininas de plantas com frutos grandes originou frutos grandes, independentemente da característica

dos frutos das plantas que forneceram a flor masculina. O interessante é que essa influência da flor feminina continua na segunda geração sem segregação aparente.

O principal atrativo das flores para os insetos visitantes é o pólen. Estudos preliminares revelaram que a fertilidade dos grãos de pólen do cubiu é baixa, pelo menos quando analisada indiretamente (com azul de algodão e tetrazólio). Além do mais, a maioria dos grãos de pólen das flores hermafroditas era inviável, ou seja, sem atividade de respiração protoplasmática (Storti, 1988).

Observações no campo demonstraram que o cubiu é visitado por sete espécies de abelhas, sendo que seis visitam as flores, e uma das espécies (*Trigona* cf. *fuscipennis*) visita somente as folhas. Essas abelhas podem ser classificadas funcionalmente nas seguintes categorias (Storti, 1988): polinizadoras, polinizadoras eventuais e pilhadoras.

#### 4.1.3.1. ABELHAS POLINIZADORAS

*Eulaema (Apeulema) nigrita* Lepeletier, 1841 (Apidae, Euglossini) - o comprimento médio dessa abelha é de 22 mm. Todos os indivíduos observados visitando as flores eram fêmeas. A partir das 06:00 h já se encontram sobrevoando a área de estudo e muitas delas estão com as corbículas carregadas de pólen, apesar das flores estarem fechadas. As 07:30 h, aproximadamente, estas abelhas iniciam suas visitas às flores. Em todo o período de observação (das 06:00 às 16:00 h) quando as flores começam a fechar, elas estão presentes no local. O horário de maior ocorrência registrado foi entre 09:00 e 10:00 h.

#### 4.1.3.2. POLINIZADORAS EVENTUAIS

*Paratrigona (Aparatrigona) impunctata* Duck (Apidae, Trigonini) - esta abelha mede 5 mm de comprimento, em média. Começa sua atividade de coleta de pólen a partir das 07:30 h, terminando por volta das 15:00 h.

*Exomalopsis (Exomalopsis) sp.* (Arthroporidae, Exomalopsini) - é uma abelha de aproximadamente 8 mm de comprimento. Os indivíduos geralmente visitam as flores as 08:00 h aproximadamente.

#### 4.1.3.3. PILHADORAS

*Trigona (Trigona) cf. fulviventris* (Apidae, Trigonini) - esta espécie mede cerca de 7 mm de comprimento. Poucos indivíduos foram vistos. O horário de visita acontece entre 08:00 e 09:00 h.

*Trigona (Tetragona) dorsalis* Smith (Apidae, Trigoni) - esta espécie mede 4 mm de comprimento, aproximadamente. Ela não é muito freqüente. Seu horário de visita é entre 08:00 e 08:30 h.

## 4.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS

Nas Tabelas 1 e 2, são apresentados valores do conteúdo de vitaminas e minerais analisados em frutos de cubiu.

Com relação ao conteúdo de umidade do cubiu, que varia de 88 a 93%, pode-se considerá-lo como um fruto suculento. A acidez elevada contribui para o sabor do fruto e permite um fator de diluição elevado na formulação de sucos e, conseqüentemente, no seu rendimento industrial para esta finalidade. O teor de sólidos solúveis (°Brix) varia de 5 a 8 e é contituido, em sua maioria, por açúcares redutores. A relação Brix/Acidez é baixa, o que confirma o seu reduzido grau de doçura e explica a preferência para o consumo do fruto *in natura*, como tira gosto de bebidas alcoólicas.

Um detalhe muito importante observado no valor nutritivo do cubiu é que ele pode ser considerado um fruto altamente dietético, face ao seu baixo aporte calórico e teores significativos de fibra alimentar. Esta evidência sugere sua indicação, nas mais variadas formas de consumo, na dieta alimentar da população amazônida, em especial aos pacientes hipercolesterolêmicos e hiperglicêmicos (Yuyama *et al.*, 1997).

Tabela 1. Composição química de 100 g de polpa integral do cubiu (*Solanum sessiliflorum*) (Pahlen, 1977; Silva Filho *et al*, 1999; Villachica, 1996; Yuyama *et al.*, 1997, Marx *et al.* 1998).

Componente	Pahlen	Villachica	Silva Filho	Yuyama	Marx
Umidade (g)	91	89	93	90	90,5
Energia (kcal)	33	41	31	45	32,1
Proteína (g)	0,6	0,9	-	0,9	-
Lipídios (g)	1,4	-	-	1,9	-
Extracto livre de N (g)	5,7	-	-	4,7	-
Fibra (g)	0,4	0,2	-	1,6	-
Cinzas (g)	0,9	0,7	-	0,9	-
Açúcares totais (%)	-	-	4,6	-	-
Açúcares redutores (%)	-	-	3,9	1	-
Açúcares não redutores (%)	-	-	1,8	1	-
Sólidos Solúveis (°Brix) %	5,0	-	8,0	-	-
Ácido Cítrico %	-	-	0,8	-	14,1
Brix/Acidez	-	-	5,93	-	-
Compostos fenólicos (mg)	-	-	14,4	-	-
Tanino (mg)	-	-	142	-	-

Tabela 2. Composição vitamínica e mineral de 100 g de polpa integral do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) (Pahlen, 1977; Silva Filho *et al*, 1999; Villachica, 1996; Yuyama *et al.*, 1998) e porcentagem da recomendação diária do National Research Council (1989).

Componente	Pahlen	Villachica	Silva Filho	Yuyama	Marx	% NRC
Ácido Ascórbico (mg)	-	4,5	13,9	-	-	15,3
Niacina (mg)	2,5	2,3	-	-	-	14,1
Caroteno (mg)	0,2	0,2	-	-	-	-
Tiamina (mg)	0,3	0,1	-	-	-	15,4
Riboflavina (mg)	-	0,1	-	-	-	6,6
Cálcio (mg)	12	16	-	-	9,9	1,2
Magnésio (mg)	-	-	-	23,7	18,8	7,5
Fósforo (mg)	14	30	-	-	38,3	1,8
Potássio (mg)	-	-	-	385,4	-	19,3
Sódio (µg)	-	-	-	371	-	74,2
Cobre (µg)	-	-	-	329	-	14,6
Ferro (µg)	-	-	-	324	250	2,6
Zinco (µg)	-	-	-	157	108	1,1
Manganês (µg)	-	-	-	97	60	2,8

### **4.3. ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA**

*Solanum sessiliflorum* var. *sessiliflorum* provavelmente teve origem via seleção indígena em algum lugar da distribuição de *S. sessiliflorum* var. *georgicum* (Whalen *et al.*, 1981), na Amazônia equatoriana ou colombiana. Schultes (1984) sugeriu que o cubiu originou na Amazônia Ocidental, onde foi primitivamente cultivado pelos ameríndios pré-colombianos, sugestão também aceita por Whalen *et al.* (1981). Brücher (1968) sugeriu, mais especificamente, que a origem do cubiu tenha sido no alto Rio Orinoco.

Humboldt e Bonpland o encontraram no Alto Orinoco (Venezuela, Colômbia), numa localidade denominada São Fernando de Atabapo, coletaram material botânico e deram-lhe o nome de *Solanum topiro* (Patiño, 1963). O cubiu era cultivado pelos índios Kareneiris, no rio Alto Madre de Dios, na Amazônia peruana. Pode-se supor que sua distribuição pré-colombiana estendeu-se ao longo dos Andes desde o rio Madre de Dios no sul do Peru, ao médio Rio Orinoco na Venezuela e Colômbia e entrou na planície amazônica ao longo dos rios principais que drenam os Andes. Ainda hoje o cubiu é mais abundante na Amazônia ocidental, sugerindo que não foi distribuído em toda a bacia amazônica na época pré-colombiana (Patiño, 1963).

Atualmente, o cubiu está distribuído na Amazônia brasileira, peruana, equatoriana, colombiana e venezuelana, bem como nos Andes, de Equador e Colômbia até 1000 m a.n.m, nos vales interandinos na Colômbia e no litoral Pacífico do Equador e Colômbia. Nos municípios ocidentais do estado do Amazonas, Brasil, principalmente na região do Alto Solimões, o cubiu é encontrado em condições sub-espontâneas, nas roças e sítios dos índios e caboclos. É menos freqüente nos estados do Pará, Rondônia, Acre e Roraima. No Peru e Colômbia, é abundante nas feiras de Iquitos e Leticia, respectivamente (Silva Filho, 1998).

### **4.4. VARIABILIDADE GENÉTICA**

Os maiores frutos de cubiu encontrados por pesquisadores do INPA são procedentes da região do Alto Solimões na Amazônia brasileira, peruana e colombiana. Pode-se supor que as populações com frutos de maior tamanho sejam mais avançadas no processo de domesticação. Kerr e Clement (1980) demonstraram que os índios da Amazônia Ocidental têm crenças que direcionam a seleção de frutos grandes durante o processo de

domesticação. No entanto, algumas populações com frutos grandes são geograficamente dispersas, sugerindo que o cubiu tenha sido levado do seu centro de diversidade na Amazônia Ocidental a outros locais em tempos mais recentes.

Pahlen (1977) e Silva Filho *et al.* (1989; 1993) relataram que, em condições adversas, o desenvolvimento da planta e o número de frutos são reduzidos, mas o tamanho das folhas e dos frutos permanece quase invariável. Isto é contrário ao que sucede com outras Solanáceas, como o tomate, pimentão, beringela e jiló, nos quais o tamanho dos frutos e das folhas varia de acordo com o desenvolvimento das plantas. Os frutos quase não variam na forma e tamanho em sucessivas gerações, nem em condições adversas, por isso, pode-se considerar esses caracteres altamente herdáveis.

Silva Filho (1994) avaliou a variação fenotípica em frutos de 29 populações de cubiu e encontrou 8 formas (Tabela 3), sendo mais comum a cordiforme (31 %) e a forma cilíndrica (21 %). Diante dessa ampla variação encontrada para o fenótipo dos frutos, parece que, do ponto de vista da industrialização do fruto, seria conveniente direcionar a seleção para o formato redondo, devido a maior facilidade de despulpá-lo mecanicamente. Na indústria caseira, o formato teria menos importância do que na agroindústria, por se tratar de uma atividade até certo ponto artesanal.

Tabela 3. Frequência de formas dos frutos (classificação de Alcazar, 1981) em 29 progênes de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) da coleção de germoplasma do INPA, avaliada em Recife, PE (Silva Filho, 1994).

Forma	Frequência (%)
Redondo/Globoso	3,5
Redondo Angular	6,9
Levemente Achatado	17,2
Achatado	3,5
Achatado Irregular	13,8
Cordiforme	31,0
Cordiforme Irregular	3,5
Cilíndrico	20,7

A polpa do cubiu é dividida em duas partes claramente distintas: a placenta (epiderme dos lóculos, suco e sementes) e polpa aderida à casca. A espessura da polpa aderida à casca é diretamente proporcional ao tamanho do fruto (Silva Filho *et al.*, 1990). Por isso, é factível a seleção de frutos pequenos com polpa menos espessa para produção de suco (maior proporção de placenta) e frutos grandes com polpa mais espessa para utilizá-los nas indústrias de doces e compotas (maior proporção de polpa aderida à casca). A placenta é mais saborosa do que a polpa aderida à casca e não oxida por um período de até 72 horas em forma de suco, enquanto a polpa aderida à casca oxida rapidamente (Silva Filho, 1994). Por isso, quanto menor a espessura da polpa aderida à casca, melhor será a qualidade do fruto para elaboração de sucos.

O cubiu apresenta variação no número de lóculos nos frutos, predominando frutos com 4 lóculos, mas existem frutos com 6 e 8 lóculos, embora com menor frequência. Os frutos com maior número de lóculos são maiores em diâmetro e freqüentemente apresentam formas irregulares. Os frutos com 4 lóculos apresentam padrão mais uniforme, com superfície mais lisa e mais resistente ao transporte (Silva Filho, 1994).

Silva Filho *et al.* (1989,1995, 1996, 1997,) estudaram os parâmetros genéticos em populações de cubiu originárias de diversas áreas da Amazônia. Os coeficientes de herdabilidade senso amplo ( $H^2$ ) estimados para o diâmetro do caule, altura da planta e área da folha foram baixos, como ocorre na maioria das espécies. Entretanto, as dimensões dos frutos (comprimento, largura, espessura da polpa, número de lóculos, peso médio do fruto e o número médio de frutos) apresentaram coeficientes de herdabilidade ( $H^2$ ) altos, variando de 0,78 a 0,93. As altas herdabilidades das dimensões dos frutos e dos componentes de produtividade confirmam as observações de Pahlen (1977), Salick (1989) e Silva Filho *et al.* (1993). Com esta alta herdabilidade é possível utilizar essas populações de cubiu em programas de melhoramento com esperança de obter ganhos genéticos significantes.

Os valores dos coeficientes de variação genética ( $CV_g$ ) de 2,7 a 41,5% indicam que as populações de cubiu apresentam extraordinária base genética para ser explorada em programas de melhoramento da seguinte maneira: a seleção dos caracteres com baixa herdabilidade deve ser praticada em gerações mais avançadas e com base em maior número

de plantas; a seleção dos caracteres com alta herdabilidade, associados à altas variâncias genéticas, poderá ser baseada no seu comportamento fenotípico, com amplas possibilidades de ganhos expressivos no processo de seleção (Falconer, 1981).

Silva Filho *et al.* (1997) observaram que cinco caracteres exercem efeito direto e positivo sobre a produção do cubiu, e são considerados de importância agrônômica; a área da folha tem papel preponderante na taxa fotossintética da planta; a largura do fruto e o número de lóculos são caracteres que estabelecem a uniformidade e a firmeza dos frutos; a espessura da polpa indica o tipo de aproveitamento que o fruto terá na indústria e, finalmente, o número médio de frutos expressa o potencial da espécie em termos de produtividade.

Os mesmos autores avaliaram as correlações entre caracteres morfológicos e químicos em frutos de cubiu, e notaram que, para a maioria dos pares de caracteres estudados, as correlações genéticas apresentaram valores superiores às fenotípicas e de ambiente, indicando que o ambiente teve menor influência que o fator genético. Entretanto, em 52 % das associações houve diferenças de sinais entre as correlações genéticas e de ambiente, o que demonstra como mecanismos fisiológicos diferentes podem causar variação.

Os caracteres largura, comprimento e peso dos frutos mantêm uma estreita correlação com o teor de umidade, sugerindo que frutos maiores são mais suculentos. Dos três caracteres físicos avaliados, o comprimento e a largura do fruto não apresentaram correlações marcantes com os químicos que pudessem ser úteis no melhoramento do cubiu.

Uma correlação positiva muito importante foi observada entre o teor de sólidos solúveis (Brix) e a acidez titulável ( $r_g = 0,62$ ). Isto é importante por duas razões: 1) o Brix é uma característica que determina a utilização do fruto, tanto para o seu consumo *in natura*, quanto ao seu aproveitamento industrial (Chan Júnior & Kwok, 1976; Mowlah & Itoo, 1982); 2) a acidez titulável é um parâmetro básico para a classificação do fruto pelo sabor (Yaselga *et al.*, 1977). Já que o °Brix e o teor de ácido cítrico das etnovarietades de cubiu variam em torno de 6,0 a 8,2 e 1,1 a 2,0 %, respectivamente, será possível buscar as combinações de genótipos que permitam melhorar o sabor dos frutos.

#### 4.5. POPULAÇÕES E RAÇAS

O Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) constituiu uma coleção de cubiu razoavelmente representativa da Amazônia brasileira nas últimas três décadas (Tabela 4). Esta coleção é mantida *ex-situ* na Estação Experimental de Olericultura e numa câmara de sementes do INPA, renovada periodicamente para manter a qualidade das sementes.

Tabela 4. Localização geográfica dos 30 acessos de *S. sessiliflorum* mantidos pelo INPA em Manaus em 1990 e usados para determinar se raças primitivas de cubiu existem (Silva Filho, 1998).

Acesso	Município	Estado/País	Localização Geográfica
01	Yurimaguas	Peru	Médio Rio Huallaga
02	Arara	Colômbia	Alto Rio Solimões
03	Atalaia do Norte	AM, Brasil	Baixo Rio Javari
04	Ponta Alegre	AM, Brasil	Médio Rio Amazonas
05	Ipiranga	AM, Brasil	Alto Rio Ica
06	Canutama	AM, Brasil	Alto Rio Purus
07	Tabatinga (Umariacu)	AM, Brasil	Alto Rio Solimões
08	Borba	AM, Brasil	Médio Rio Madeira
09	Tefé	AM, Brasil	Médio Rio Solimões
10	Carauari	AM, Brasil	Alto Rio Juruá
11	Benjamin Constant	AM, Brasil	Alto Rio Solimões
12	Nova Olinda do Norte	AM, Brasil	Médio Rio Madeira
13	Eirunepé	AM, Brasil	Alto Rio Juruá
14	Parintins	AM, Brasil	Médio Rio Amazonas
15	Coari	AM, Brasil	Médio Rio Solimões
16	Betânia	AM, Brasil	Médio Rio Ica
17	Estirão do Equador	AM, Brasil	Alto Rio Javari
18	Tarapoto	Peru	Médio Rio Mayo
19	Iquitos	Peru	Médio Rio Marañon
20	Lábrea	AM, Brasil	Médio Rio Purus
21	Putumayo	Colômbia	Médio Rio Putumayo
22	Cucuí	AM, Brasil	Alto Rio Negro
23	Vila Bitencourt	AM, Brasil	Alto Rio Japurá
24	Palmeiras	AM, Brasil	Alto Rio Javari
25	São Gabriel da Cachoeira	AM, Brasil	Alto Rio Negro
26	Barcelos	AM, Brasil	Médio Rio Negro
27	Belém	PA, Brasil	Foz do Rio Amazonas
28	Mavuruna	AM, Brasil	Alto Rio Javari
29	São Paulo de Olivença	AM, Brasil	Alto Rio Solimões
30	Benjamin Constant	AM, Brasil	Alto Rio Solimões

A coleção é usada principalmente no programa de melhoramento, mas também tem sido usada para determinar a possibilidade da existência de variedades tradicionais (landraces) de cubiu, como existem em outras fruteiras amazônicas. Clement (1989) sugeriu

que existe pelo menos uma raça de cubiu no alto Rio Solimões, e a incluiu como evidência para apoiar a existência de um centro de diversidade de cultivos amazônicos naquela região. Uma raça primitiva é um conjunto de indivíduos que compartilham de um conjunto gênico comum e que foram submetidos a pressões seletivas semelhantes, praticadas por grupos humanos (étnicos) na mesma região geográfica relativamente restrita. Como corolário deste conceito, uma etnovariabilidade é um conjunto de genes/genótipos mantidos por um grupo étnico (Silva Filho, 1998).

Na concepção de Brauer (1976), a variação que se pode encontrar dentro de uma população de plantas autógamas, dependendo do número de linhas que a formam, é compatível com a oportunidade das trocas gênicas havidas dentro da população. Em casos extremos, uma população de plantas autógamas pode estar constituída por um grande número de linhas puras diferentes, incluindo uma ampla variação ou pode estar representada por uma única linha pura e ser, portanto, invariável (Pohelman, 1979).

Em plantas cultivadas, a mistura de sementes provenientes de outras plantas, a hibridação casual e as mutações são fatores que introduzem variação. A hibridação casual depende muito da existência de plantas da mesma espécie numa pequena distância e, finalmente, da eficácia do mecanismo de autofecundação de cada espécie ou variedades. É a existência desta variação que permite a eficácia da seleção indígena ao longo do tempo e a criação de raças.

Numa análise discriminante preliminar (não publicada), os acessos foram agrupados por bacias hidrográficas. Segundo Clement (1989) as raças de pupunha são estreitamente relacionadas com as bacias dos principais tributários, e alguns secundários, do Rio Amazonas. A porcentagem de classificação foi baixa, principalmente por causa dos acessos que originaram fora da Amazônia ocidental, a distribuição pré-colombiana do cubiu. Quando os acessos coletados fora da Amazônia Ocidental foram retirados da análise, a porcentagem de classificação melhorou sensivelmente, sugerindo a existência de raças (Tabela 5). Deve-se ressaltar que para determinar a existência de raças, será imprescindível ampliar o número de acessos de cada uma das populações usadas, dada a possibilidade de que um acesso seja uma linha pura que não representa bem as características gerais da população. Isto, será

possível, com o apoio do INPA que tem um programa ativo de coleta na Amazônia ocidental.

Tabela 5. Possíveis raças primitivas de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) na Amazônia Ocidental. Consulte a Tabela 4 para verificar a procedência dos acessos.

Raça	Acessos incluídos
Alto Solimões	2, 7, 11, 29, 30
Javari	3, 17, 24, 28
Negro	22, 25, 26
Içá	5, 16, 21

## 4.6. ASPECTOS ECOLÓGICOS

### 4.6.1. CLIMA

O cubiu é originário da Amazônia ocidental e, portanto, está adaptado ao clima desta região. No entanto, por ter sido domesticado e distribuído pelos povos indígenas do noroeste da América do Sul, o cubiu pode também adaptar-se a outros climas.

#### 4.6.1.1. CLIMA DA AMAZÔNIA OCIDENTAL

O clima da Amazônia Ocidental é classificado como "A" (clima tropical chuvoso) no esquema de Köppen, o qual abrange os tipos climáticos "Am" e "Af" (RADAMBRASIL, 1977). O tipo climático "Am" (chuvas do tipo monção) apresenta estação seca de pequena duração, geralmente sem influência significativa no comportamento da vegetação, e ocorre no sudoeste da Amazônia. O tipo climático "Af" (constantemente úmido) apresenta um mínimo de variação anual, tanto a temperatura quanto a chuva, e mantém-se sempre num nível elevado, ocorrendo no noroeste da Amazônia.

Na zona climática "Am" a pluviosidade varia entre 2000 e 2750 mm, com uma estiagem variando de 1 a 3 meses, geralmente, no período entre julho e outubro. A temperatura média anual apresenta-se entre 27 e 32 °C. Em Iquitos, Peru, por exemplo, a pluviosidade média anual é 2400 mm e a temperatura média de 31 °C (Salati, 1985).

Na zona climática "Af" a pluviosidade varia entre 2750 e 3500 mm, sem uma estiagem regular, embora possam haver períodos curtos (menores que um mês) de estiagem isolada. Por ser mais chuvosa, a temperatura média anual é um pouco menor, entre 26 e 30 °C. Em Leticia, Colômbia, por exemplo, a pluviosidade média anual é 3000 mm e a temperatura média é 27 °C (Salati, 1985).

Por sua posição geográfica equatorial, o comprimento do dia na Amazônia ocidental apresenta apenas uma pequena variação durante o ano: na posição 5° N, o dia tem duração de 11 horas e 50 minutos em dezembro e 12 horas e 24 minutos em julho - uma variação máxima de 32 minutos; na posição 10° S, o dia tem a duração de 12 horas e 42 minutos em dezembro e 11 horas e 32 minutos em junho - uma variação máxima de 50 minutos (Salati, 1985). Tanto a insolação quanto a energia disponível na região dependem diretamente desta duração, embora sejam influenciadas pela umidade do ar e a formação das nuvens.

A evapotranspiração potencial na Amazônia ocidental está sempre acima de 1400 mm anuais, sendo que a estação meteorológica de Tabatinga, Amazonas, Brasil, já registrou um máximo de 1718 mm/ano (RADAMBRASIL, 1977). As folhas herbáceas do cubiu mostram claramente quando a transpiração excede a absorção de água pelas raízes, pois murcham facilmente.

#### 4.6.1.2. CLIMA EM OUTRAS ÁREAS ONDE O CUBIU É CULTIVADO

Hoje o cubiu é encontrado na maior parte da Amazônia brasileira, principalmente nas zonas climáticas "Am" e "Aw". Nesta última, na Amazônia oriental, a pluviosidade média anual pode chegar a apenas 1200 mm e a temperatura média anual varia entre 28 e 32 °C. Nesta zona o cubiu não cresce na terra firme em plantio aberto sem irrigação, pois a estiagem anual pode chegar a 6 meses de duração. Logicamente, na várzea, não existem estas limitações (Silva Filho, 1998).

Nos Llanos da bacia do Rio Orinoco, na Venezuela e Colômbia, a zona climática é "Aw", com pluviosidade variando de 1000 a 1700 mm e temperatura média anual 28°C. Como ocorre na Amazônia oriental, o cubiu requer irrigação em plantio aberto (Silva Filho, 1998).

No litoral Pacífico de Colômbia - el Choco - a pluviosidade média chega a 5000 mm, e existe uma área que atinja até 8900 mm, com uma temperatura média anual variando de 24 a 27 °C, sendo uma zona climática "Af". Nesta região, não ocorre estiagem e, portanto, o cubiu não precisa de irrigação (Villachica, 1996).

#### 4.6.1.3. LIMITAÇÕES CLIMÁTICAS

Dentro da distribuição geográfica do cubiu e as zonas climáticas em que ocorre, conclui-se que o cubiu cresce bem nas zonas climáticas "Af" e "Am", com preferência por zonas com pouco ou nenhuma estiagem. Em outras áreas o cubiu poderá requerer irrigação quando plantado em áreas abertas, na terra firme (Silva Filho, 1998).

#### 4.6.1.4. ALTITUDE

O cubiu é cultivado em altitudes que variam desde o nível do mar até 1.500 m acima do nível do mar (Villachica, 1996; Silva Filho & Machado, 1997). No entanto, acima de 1.000 m sua produção é reduzida, chegando a não produzir economicamente a 1.500 m. Também, à medida que o cultivo se afastar do equador, a altitude máxima para a produção econômica deverá ser menor, porém não existem dados publicados sobre estes casos.

### 4.6.2. SOLO

O cubiu cresce na maioria dos solos da Amazônia, desde os latossolos e podzólicos ácidos e de baixa fertilidade, da terra firme com texturas desde arenosa a argilosa, até os gleis húmicos, neutros e de alta fertilidade da várzea, com texturas desde limo-arenosa a limo-argilosa, (Villachica, 1996; Silva Filho & Machado, 1997), porém, não cresce bem em solos encharcados. Como outras fruteiras, o cubiu produz melhor em solos mais ricos em nutrientes. Os três principais grupos de solos em que se tem observado o cultivo do cubiu, embora, seguramente, o cubiu também tenha condições de crescer em outros solos, são:

#### 4.6.2.1. LATOSSOLO AMARELO

O Latossolo Amarelo é o que ocorre em maior extensão na região, sempre na terra firme. É caracterizado por um perfil de 1,50 m ou mais de espessura, assentado sobre arenitos e argilitos de Formação Barreiras. Trata-se de solos envelhecidos, ácidos a fortemente ácidos e de boa drenagem, apesar de, por vezes, apresentarem-se bastante argilosos. O horizonte B latossólico (óxico) possui evidência de um estágio avançado de intemperização, e consiste de uma mistura de óxidos hidratados de ferro e alumínio, com

variável proporção de argila 1:1 e minerais acessórios altamente resistentes (principalmente quartzo). Os latossolos amarelos possuem somas de bases (extraídas pelo acetato de amônio, mais alumínio por KCl) menor que 10 me/100g de argila. Frequentemente, são álicos (quando a saturação com alumínio for maior que 50%), possuem menos que 5% de argila dispersa em água e baixa percentagem de silte (menor que 8% ou para a Formação de Barreiras menor que 15%). O quociente silte/argila é geralmente menor que 0,25 (Vieira, 1975).

#### 4.6.2.2. PODZÓLICOS VERMELHO AMARELO

Ainda na terra firme, os Podzólicos Vermelho Amarelo ocorrem em relevo plano, suavemente ondulado, até fortemente ondulado, em associação com outros tipos de solos. São profundos a medianamente profundos, moderadamente a bem drenados. Nesses solos observa-se um decréscimo acentuado de ferro e alumínio em comparação com os latossolos. Certos fatores naturais, como a água de percolação das chuvas e remoção erosiva das camadas superficiais, contribuem para a retirada constante dos elementos cálcio e magnésio do complexo coloidal do solo, provocando acidificação, baixa soma de bases (S), variável capacidade de troca de cátions (T) e alteração na saturação de bases (V). Os valores de T.S.V.% são mais elevados no horizonte A, em decorrência da maior retenção de cátions proporcionada pela maior quantidade de matéria orgânica. O fósforo assimilável na maior parte dos perfis tem teores baixos e a relação silte/argila apresenta valores superiores a 0,65 (Sanchez *et al.*, 1982).

#### 4.6.2.3. GLEIS HÚMICOS

Nas várzeas dos rios de água branca, os solos são do tipo Gley Distrófico pouco húmico, álico, e de boa fertilidade natural. Esses solos são formados a partir de sedimentos transportados dos Andes e depositados pelos rios. O material sedimentar é constituído primordialmente por silte, areias finas e argilas. Por isso, originam solos recentes com um horizonte A normalmente repousando diretamente sobre um horizonte C, subdividido em camadas de textura e espessuras variáveis, e sem relação genética entre si. São solos ácidos a neutros, podendo ou não apresentar somas de bases alta. A fertilidade natural varia de média a alta, traduzida pela saturação de bases quase sempre acima de 50%. As quantidades de cálcio, magnésio, sódio e potássio do complexo sortivo são bastante reduzidas, em

contraste aos teores relativamente elevados de alumínio. Tal situação condiciona uma alta saturação do alumínio trocável. A matéria orgânica presente no horizonte A sempre tem teores significativos. Entretanto, o seu conteúdo decresce irregularmente de acordo com a profundidade, devido ao desenvolvimento incipiente do perfil (Vieira, 1975).

#### **4.7. USOS ECONÔMICOS DAS SOLANÁCEAS COMESTÍVEIS**

Várias espécies de *Solanum* e de outros gêneros são cultivadas por suas flores vistosas, outras por seus frutos coloridos e comestíveis. Entre as espécies alimentícias mais populares da família Solanaceae estão a batata (*Solanum tuberosum*), berinjela (*Solanum melongena*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), vários tipos de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp), nelas incluídas a páprica, chillies (um tipo de pimenta, pimenta da Cayena, pimentas verdes, vermelhas e doces). Outras espécies populares na América tropical, mas relativamente pouco conhecidas fora da região inclui o husk tomato (*Physalis pubescens*), o tomatillo (*P. ixocarpa*), o cape gooseberry (*P. peruviana*), o tamate de árvore (*Cyphomandra betacea*), o pepino (*Solanum muricatum*), a cocona (*S. subsessilis* = *S. topiro*), a lulita (*S. hirsutissimum*) e a naranjilla ou lulo (*S. quitoense*) (Heywood, 1978).

O tabaco (*Nicotina tabacum*) é extensivamente cultivado para uso como fumo, sendo uma das plantas mais populares do mundo. Muitas espécies do gênero contêm nicotina, um alcalóide altamente tóxico que é também usado como inseticida nas culturas agrícolas (Heywood, 1978).

Algumas espécies da família são de uso medicinal e tóxico, dos gêneros *Cestrum*, *Nicandra*, e *Physalis*. Notoriamente venenosas são as espécies conhecidas como beladona ou deadly nightshade (*Atropa belladonna*), junson weed ou astramônio (*Datura stramonium*), o mandrake (*Mandragora officinarum*) e o black henbane (*Hyoscyamus niger*). Estas plantas são usadas na medicina tradicional e contêm alcalóides do grupo dos tropanos. Alcalóides esteróides são característicos de muitos *Solanum* e de algumas espécies de *Capsicum* e de *Lycopersicum* (Heywood, 1978).

## **4.8. USOS DO CUBIU**

### **4.8.1. USO PRINCIPAL - ALIMENTÍCIO**

O cubiu tem um sabor tão característico que não se pode comparar com o sabor de outras frutas. No entanto, algumas pessoas dizem que lembra o sabor de tomate e limão juntos, o que faz sentido já que o cubiu perdeu sua importância quando as duas últimas espécies foram introduzidas na Amazônia. Embora aparentado com a naranjilla, o sabor é distinto. Seus nomes em inglês, Orinoco apple e peach tomato, tampouco se referem ao sabor, pois não lembra o sabor da maçã nem do pêssego. A maior semelhança está na forma e na cor da polpa (Silva Filho, 1998).

A polpa da placenta é ligeiramente mais ácida e bem mais saborosa do que a polpa aderida à casca. Em algumas etnovarietades a polpa apresenta um sabor levemente amargo, que pode ser em função do solo ou da água com a qual é irrigado. Devido a baixa relação brix/acidez 3,5 a 6,0, o cubiu apresenta reduzido grau de doçura. Por isto, o fruto é raramente consumido *in natura*, exceto como tira gosto com bebidas alcóolicas.

O preparo de sucos, doces, geléias e compotas é a utilização principal dos frutos. Os frutos também podem ser consumidos na forma de molho para acompanhar churrasco de coração bovino (conhecido na Amazônia peruana como "antecuche") e nas sopas de peixe, popularmente denominadas de "caldeirada" ou "peixada", na Amazônia brasileira.

### **4.8.2. USOS SECUNDÁRIOS**

#### **4.8.2.1. MEDICINAL**

O cubiu é valorizado pelas populações tradicionais da Amazônia Ocidental por sua capacidade de curar doenças da pele (Salick, 1987). As folhas maceradas são utilizadas pelos índios peruanos e brasileiros para evitar a formação de bolhas na pele em caso de queimaduras provocadas por fogo ou água fervente (Sr. Paulo Cruz, Aldeia Umariáçu, Tabatinga, AM, e Dr. Pedro Mera, Iquitos, com. pess., 1997). O suco da cavidade locular dos frutos é utilizado no controle de coceiras da pele (Sr. Nuquito José, Aldeia de Umariáçu, Tabatinga, AM, com. pess.).

O suco puro é utilizado pelas populações tradicionais da Amazônia brasileira, peruana e colombiana para controlar colesterol, diabetes, excesso de ácido úrico e outras doenças

causadas pelo mal funcionamento dos rins e do fígado (Salick, 1987). O cubiu é recomendado para a dieta de pacientes hipercolesterolêmicos e hiperglicêmicos (Yuyama *et al.*, 1997).

#### 4.8.2.2. COSMÉTICO

Os caboclos e índios peruanos utilizam o suco puro do cubiu para dar brilho aos cabelos (Silva Filho, 1996). É possível que algumas vitaminas e a pectina sejam responsáveis por esta crença. Entretanto, este uso requer mais pesquisa, pois o mercado para produtos cosméticos é enorme e crescente.

### 4.9. FORMAS DE COMERCIALIZAÇÃO DO CUBIU

A comercialização do cubiu é feita em pequena escala, por produtores rurais, nas feiras, mercados e nas suas próprias casas, bem como na base de troca com os vizinhos. Nas maiores cidades da Amazônia Ocidental (Iquitos e Pucallpa, Peru; Leticia, Colômbia) existem pequenas cadeias de comercialização, com os produtores vendendo frutos para intermediários (geralmente no porto da cidade), que os comercializam nas feiras e mercados. Raramente tem mais uma etapa na cadeia, quando o intermediário vende os frutos para o feirante, que os comercializa ao consumidor final (Silva Filho, 1998).

Os frutos são vendidos por unidade, dúzia, sacolas ou peso (quilograma), sendo o último o mais comum. O preço varia em cada localidade da Amazônia brasileira, peruana e colombiana. No início de 1998, o quilo dos frutos valia R\$ 1,00 (Real \$ 1,00 = US\$0,87) em Benjamim Constant e Tabatinga (municípios da região do Alto Solimões, Brasil), S\$ 2,80 (Sole\$ 1,00 = US\$ 0,36) em Iquitos (Amazônia peruana) e P\$ 1.150 (US\$ 1,00 = Peso\$ 1.150) em Leticia (Amazônia colombiana) (Silva Filho, 1998).

Nas lanchonetes, restaurantes e hotéis das cidades da Amazônia Ocidental, especialmente em Iquitos e Leticia, sucos e sorvetes são as principais formas de comercialização. Neste caso, o valor cobrado varia, pois depende da categoria e localização do estabelecimento. Em Leticia, um copo de suco com 300 ml valia P\$ 1.000 (US\$ 0,87) no início de 1998, com a matéria prima custando apenas US\$ 0,07 (Silva Filho, 1998).

No Peru, a pequena produção de sucos e néctares industrializados é comercializada em outras partes do país, especialmente em Lima. Este mercado pequeno parece ser limitado

pela falta de marketing, pois não está expandindo de forma importante. Como no caso dos sucos vendidos em restaurantes, o valor cobrado pelo produto industrializado depende do ponto de venda. Supõe-se que uma garrafa de 500 ml vale ao redor de S\$ 4,00 (US\$ 1,45), baseado no valor de um suco de fruto *in natura*, na Amazônia (Silva Filho, 1998).

#### **4.10. ASPÉCTOS BÁSICOS DE QUIMIOTAXONOMIA OU SISTEMÁTICA BIOQUÍMICA.**

Esta disciplina trata do estudo comparativo dos compostos químicos que ocorrem nos organismos e de suas possíveis aplicações na taxonomia clássica. No caso da quimiotaxonomia vegetal, já se encontram bem estabelecidos o uso da ocorrência, a estrutura e as vias biossintéticas de compostos do metabolismo secundário ou micromoléculas (compostos de baixo peso molecular) como marcadores quimiotaxonômicos. As plantas são extremamente ricas em compostos secundários e estes foram os primeiros a ser utilizados para fins taxonômicos (Hegnauer, 1986). Dentre as classes de compostos secundários que têm sido exploradas com enfoque taxonômico, podem ser citados os aminoácidos não-protéicos, alcalóides, terpenóides, constituintes fenólicos (fenóis simples e flavanóides, principalmente), quinonas, alcanos, ácidos graxos, compostos acetilênicos e sulfurosos, poliálcoois e glicosídeos (Reinold & Liwschitz, 1986).

##### **4.10.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LECTINAS**

A primeira referência sobre lectinas foi feita há mais de 100 anos em extratos de sementes de *Ricinus cummunis* os quais possuíam proteínas capazes de aglutinar eritrócitos. Estas proteínas foram inicialmente conhecidas como hemaglutininas vegetais e, posteriormente, fitohemaglutininas, por serem encontradas, na época, quase exclusivamente em vegetais. No decorrer dos anos, estas proteínas despertaram grande interesse em diversos campos da ciência e hoje milhares de trabalhos são desenvolvidos em busca de descobertas que possam ser úteis para toda a humanidade (Reinold & Liwschitz, 1986).

O nome lectina (do latim *legere*, escolher) foi proposto por Boyd & Shapleigh (1954) para definir um grupo de proteínas que possuem a capacidade de reagir com certos tipos de células, devido ao fato de serem especificadas para um determinado tipo de açúcar e seus derivados.

#### 4.10.2. OCORRÊNCIA E LOCALIZAÇÃO DE LECTINAS

As lectinas são encontradas em todas as classes e famílias de seres vivos, desde bactérias e vírus até mamíferos (Liener *et al.*, 1986). Em invertebrados, são encontradas em quase todas as classes e subclasses tais como: caranguejos (Umetsu *et al.*, 1991), larvas de insetos (Grubhoffer & Matha, 1991), carrapatos e moluscos (Veres & Grubhoffer, 1991), e ouriço do mar (Yamada & Aketa, 1982).

Nos vertebrados, lectinas foram encontradas em veneno de cobra (Gartner & Ogilve, 1984), no fígado de vários animais (coelho, rato e galinha), tanto nos hepatócitos como nas células de Kupffer, associadas à membrana plasmática e membranas intracelulares (Sharon & Lis, 1989), no cordão umbilical humano e em peixes (Desai & Springer, 1972).

Em vegetais superiores, onde as lectinas têm sido mais estudadas, o maior número já isolado e caracterizado pertence à classe das Dicotiledôneas, principalmente no táxon Leguminosae (Peumans *et al.*, 1986; Liener *et al.*, 1986). Entre as Monocotiledôneas, o táxon Gramineae concentra o maior número de estudos (Van Damme *et al.*, 1988).

Nas sementes maduras concentram-se as principais fontes de lectinas, podendo chegar até 10% do conteúdo protéico total (Sharon & Lis, 1989). Em sementes de leguminosas, a lectina está localizada principalmente nos cotilédones (Bosseau *et al.*, 1984). Nas Euphorbiáceas (*Ricinus communis*), no endosperma (l.c, 1989). Nas gramíneas, elas se encontram principalmente no embrião e raízes de plântulas (Raikhel & Liener, 1991). Nas Amarillidaceae e nas Alliaceae, as folhas, tubérculos, e rizomas são as partes em que mais se concentram lectinas em muitas espécies (Van Damme *et al.* 1991). Nas Solanáceas, a *Solanum tuberosum* tem sido a mais pesquisada.

#### 4.10.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE LECTINAS

A maior parte das lectinas é glicoproteínas, com teores de açúcares chegando até 50 %, como é o caso da lectina de batata (Allen *et al.*, 1978). As lectinas geralmente exigem a presença de íons metálicos divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ ) para exercerem suas atividades biológicas. A presença desses íons na molécula é essencial para formação e estabilização do sítio de ligação a carboidratos (Sharon & Lis, 1989). As lectinas são ricas em ácido

aspártico, serina e treonina e pobres em aminoácidos sulfurados, com exceção das lectinas de Gramíneas e Solanaceas que são ricas em cisteína (l.c, 1989).

Uma importante característica estrutural das lectinas é a sua capacidade de formar agregados dependendo do pH em que elas se encontram. Em pH entre 5,0 e 8,0 a lectina de *Dioclea grandiflora* apresenta-se como um tetrâmero com massa molecular aparente de 100 Kda. Em pH acima de 8,0, encontra-se na forma de agregados de peso molecular mais elevado, e em pH abaixo de 5,0, sua estrutura é na forma de dímero (Moreira *et al.*, 1993).

#### 4.10.4. POSSÍVEIS FUNÇÕES ENDÓGENAS DAS LECTINAS VEGETAIS

Apesar dos grandes avanços das pesquisas, as funções biológicas desempenhadas pelas lectinas não são ainda bem compreendidas, mas vários destes papéis resultam de sua capacidade de ligação a açúcares na superfície celular. Um exemplo dos mais investigados, a interação simbiótica entre leguminosae-*Rhizobium* envolveria a lectina presente nas raízes da planta. A ligação do microorganismo às raízes ocorre pela interação direta entre carboidratos da superfície da bactéria e a lectina presente nas raízes (Sharon & Lis, 1989).

A capacidade das lectinas, através de especificidade por açúcar, para distinguir diferentes tipos de células, sugere um papel de defesa contra organismos patogênicos. Além disso, desempenham alguma função no crescimento e alongamento da parede celular, na ação seletiva para a estimulação mitótica de callus e protoplasto, no transporte e armazenamento de carboidratos, no reconhecimento células de reserva ou como reguladores de crescimento (Sharon & Lis, 1989).

Alguns autores têm demonstrado que a atividade de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas pode ser regulada por hormônios vegetais. A ligação da lectina de amendoim (PNA) à lactose é inibida por adenina, o precursor das citocininas (Zaluzec *et al.*, 1990). A atividade hemaglutinante de várias lectinas (PHA, UEA-I, RCA, SBA, PNA, WGA e LCA) pode ser modulada (inibida ou ativada) pelo ácido indolacético (AIA), um hormônio natural do grupo das auxinas e por triptofano, o precursor natural das auxinas (Sharon & Lis, 1989).

#### 4.10.5. APLICAÇÕES DE LECTINAS

A existência de lectinas com diferentes especificidades para carboidratos possibilita a interação destas proteínas com diversos sistemas, tornando possível a sua utilização em diversos campos de estudo. Uma das primeiras aplicações clínicas das lectinas foi na tipagem sanguínea e na elucidação da estrutura química dos determinantes de grupos sanguíneos do sistema ABO (Sharon & Lis, 1989).

Estudos de inibição por haptenos com lectinas de *Phaseolus limensis* e *Vicia craca*, específicas para o grupo A, e de *Lotus tetraganobus* e *Anguilla anguilla*, específicas para o grupo O, possibilitaram a descoberta de que os açúcares N-acetil-galactosamina e L-Fucose são os responsáveis pela especificidade dos grupos sanguíneos A e O (H), respectivamente (Sharon & Lis, 1989). A lectina de *Dolichos biflorus* e de *Crotalaria striata* (Oliveira *et al.*, 1989) distingue os tipos sanguíneos A<sub>1</sub> do A<sub>2</sub>.

As lectinas têm-se mostrado ferramentas poderosas nos estudos de transformação maligna (Freeman, 1983), de diferenciação embrionária (Watanabe *et al.*, 1982) e maturação celular (Zieske & Bernstein, 1982). A lectina de *Ricinus communis* e outras lectinas citotóxicas de plantas vêm sendo usadas na terapia do câncer (Lord, 1987).

Lectinas são capazes de diferenciar algumas espécies de microorganismos devido à sua afinidade por glicoproteínas da superfície celular. A espécie *Neisseria gonorrhoeae* pode ser diferenciada de outras do gênero *Neisseria* face a sua aglutinação pela lectina de germe de trigo (Schaefer *et al.*, 1979)

A lectina de soja aglutina *Bacillus mycoides* e *Bacillus anthracis*, enquanto a lectina de *Helix pomatia* aglutina apenas o *Bacillus mycoides* (Cole *et al.*, 1984). A lectina Con A aglutina apenas a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, não aglutinando a forma sanguínea tripomastigota (Alves & Colli, 1974). A separação de células por aglutinina de soja provou ser útil em transplantes de medula óssea entre indivíduos geneticamente não idênticos, porque é capaz de remover da medula óssea a maioria das células responsáveis pela rejeição de enxertos (células T) (Sharon & Lis, 1989).

Para a agricultura, as lectinas têm mostrado boas perspectivas no controle de pragas que atacam as plantas. As lectinas de *Canavalia ensiformis* e de *Limax flavus* são utilizadas para controlar nematóides que parasitam o tomateiro (Alves & Colli, 1974).

#### 4.10.6. USO DE LECTINAS COMO MARCADORES QUIMIOTAXONÔMICOS

Sharon & Lis (1989) estudaram lectinas de sementes de leguminosas da sub-família *Papilionoideae* da Venezuela e verificaram que as espécies da tribo *Dalbergae* exibem um comportamento bastante similar entre si, em relação aos eritrócitos que aglutinam. Também, na sub-tribo *Diocleinae* todas as espécies apresentam atividades hemaglutinantes com eritrócitos de ganso e de coelho, tratados com pronase.

Comparando a sequência de aminoácidos das lectinas de algumas tribos *Vicieae*, *Diocleae*, *Glycineae*, *Hedysareae* e *Phaseoleae*, Rougé (1987) observou que quanto mais próximas filogeneticamente estavam as espécies, maior era o grau de homologia existente entre a sequência de seus aminoácidos.

Van Damme *et al.* (1991) compararam as lectinas de representantes das famílias *Amaryllidaceae* e *Alliaceae*, e detectaram que elas apresentam várias características em comum, tais como: especificidade por açúcar, estrutura molecular e composição em aminoácidos.

#### 4.11. MARCADORES MOLECULARES

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, deficiência clorofítica, cor de pétala ou morfologia foliar. Marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção dos primeiros mapas genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A utilização de marcadores em melhoramento iniciou-se junto com o desenvolvimento da pesquisa genética após a I Guerra Mundial. Nesta época, surgiram os primeiros mapas genéticos como o de *Drosophila* (Stutervant, 1913), o do milho (Emerson *et al.*, 1935) e do tomateiro. Assim, começou a expansão do uso de marcadores em melhoramento. Desta

forma, se um determinado marcador, de fácil identificação fenotípica, estiver fisicamente ligado a pequena distância de um gene que controla um caráter de interesse agrônomo, a seleção deste marcador resulta na seleção indireta deste gene de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Entretanto, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem, reduzia a probabilidade de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres de importância econômica através do estudo de populações segregantes. Portanto, só ocasionalmente é que marcadores morfológicos ligados a características de importância econômica eram identificados. Além disso, a disponibilidade de marcadores morfológicos era restrita às espécies como ervilha, milho e tomate por serem utilizadas como modelos para estudos de genética. Além destes aspectos, marcadores morfológicos apresentam ainda a desvantagem de serem somente identificados, em sua maioria, a nível de planta inteira ou adulta. Por outro lado, marcadores bioquímicos ou moleculares podem ser usados para caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de amostras de células ou de tecidos. A identificação de genótipos em estádios iniciais de desenvolvimento da planta abre a possibilidade de acelerar o processo da seleção e recombinação dos indivíduos desejados, reduzindo o tempo necessário para completar uma geração de melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma). Marcadores isoenzimáticos são muitas vezes chamados de bioquímicos. A sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas e, em geral, são desconhecidas. Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas da herança de Mendel, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Os marcadores de DNA começaram a ser utilizados na década de 80. A maior vantagem da utilização destes marcadores é a grande variabilidade que se observa entre os indivíduos de uma mesma espécie. Os marcadores de DNA podem ser classificados em três

grandes grupos: os que utilizam enzimas de restrição, os baseados em PCR e um outro grupo que resulta de uma combinação dos outros dois.

Os marcadores baseados em PCR ("Polymerase Chain Reaction" ou Reação da DNA Polimerase em Cadeia) podem ainda ser divididos em específicos e não-específicos (iniciadores arbitrários). A tecnologia da PCR foi concebida por Kary Mullis, na década de 80 (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985). Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais como em áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos.

Nas áreas médicas, odontológicas e veterinárias, a metodologia PCR vem proporcionando numerosos exemplos de uso, notadamente no estudo do câncer (Singh & Roy, 1999; Vinyals *et al.*, 1998; Veltry *et al.*, 1999; Achille *et al.*, 1998, Kawakami *et al.*, 1998; Juan *et al.*, 1998), na caracterização de microrganismos parasitas e/ou patogênicos, como *Bartonella henselae* (Sander *et al.*, 1998) e *Clostridium difficile* (Rafferty *et al.*, 1998), dentre outras aplicações.

A PCR é uma técnica sensível, rápida, versátil, fácil e que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento do DNA, na presença de DNA polimerase. Originalmente, a técnica da PCR baseou-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeo (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores, ou "primers", que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. A desnaturação da fita alvo, o anelamento dos iniciadores e extensão do segmento caracterizam um ciclo de amplificação. Este ciclo é repedido várias vezes, de modo que a amplificação se dá de maneira exponencial. A reação ocorre na presença da amostra de DNA alvo, da enzima DNA polimerase, de iniciadores sintetizados em laboratórios e específicos para a seqüência alvo e de nucleotídeos. Esta técnica é classificada como específica por utilizar iniciadores de seqüência determinada e não aleatória.

Durante os primeiros anos de utilização da técnica, foi utilizada a enzima DNA polimerase extraída de *E. coli* cuja temperatura ótima de funcionamento é de 37 °C. Porém, sempre que um ciclo terminava e o posterior dava início com a etapa de desnaturação, a

enzima era desnaturada. Atualmente utiliza-se a DNA polimerase extraída de uma bactéria termófila a *Thermus aquaticus*, a *Taq* DNA polimerase, que polimeriza a uma temperatura ótima de 72 °C e que se mantém viável mesmo após ser exposta a temperaturas de 90 a 96 °C, faixa de temperatura da desnaturação (Saiki *et al.*, 1988).

Um dos aspectos fundamentais da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma, a partir de quantidades muito pequenas, da ordem de alguns nanogramas. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos. Todavia, a construção de “primers” dependia de um conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos da amostra alvo, o que requeria um extenso protocolo que envolvia clonagem e sequenciamento da região.

O grande avanço da utilização da PCR em marcadores moleculares ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar iniciadores menores e de seqüência arbitrária, eliminando a necessidade do conhecimento prévio da seqüência alvo. Esta nova técnica foi desenvolvida em paralelo por dois grupos nos Estados Unidos, de modo que em 1990, Williams *et al.* a patentearam com o nome mais comumente conhecido, RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA ou Amplificação Randômica de DNA Polimórfico). O outro grupo, coordenado por Welsh & McClelland, também em 1990, propuseram a denominação mais apropriada para esta técnica, chamando-a de AP-PCR (“Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction”), pois os “primers” possuem seqüência arbitrária mas a (as) região (ões) tecnicamente não são amplificadas ao acaso. No ano seguinte, em 1991, um terceiro grupo, Caetano-Anólles *et al.*, desenvolveram o mesmo método, batizando-o de DAF (“DNA Amplification Fingerprint ou Amplificação de Impressões Digitais de DNA). Para que haja amplificação deste segmento, o DNA da amostra deve possuir seqüências complementares aos iniciadores arbitrários, em direção oposta e suficientemente adjacente (<4.000 pares de bases) (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Independente do nome utilizado e das pequenas variações da metodologia, a técnica de PCR utilizando “primers” de seqüência arbitrária abriu uma perspectiva inteiramente nova para a análise genômica de indivíduos e populações. Além de facilitar e acelerar os

estudos que já ocorriam com as espécies mais tradicionais, como milho, tomate e arroz, a tecnologia RAPD trouxe uma verdadeira “democratização” da análise de polimorfismo molecular ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas. Desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD na análise genética e no melhoramento de plantas tem tido uma difusão extremamente rápida. Podemos citar como aplicações desta tecnologia (Rafalski *et al.*, 1991; Caetano-Annóles *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1993; Tingey & Deltufo, 1992; Ferreira & Grattapaglia, 1995):

1. a obtenção de “fingerprints” genômico de indivíduos, variedades e populações;
2. a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e banco de germoplasma;
3. o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies;
4. a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico;

Welsh e McClelland (1990) reportaram que PCR, com o uso de “primers” selecionados arbitrariamente amplificando um conjunto específico de *loci* em qualquer genoma, pode ser usado com um grande número de marcadores genéticos para um variado número de propósitos. Desde então, o número de trabalhos com essa metodologia é extraordinário. As razões para esse sucesso foram discutidas por Williams *et al.* (1990).

A metodologia RAPD é muito sensível nas condições da reação. Pequenas mudanças na concentração dos reagentes ou do DNA da amostra poderão determinar mudanças nos resultados. Khandka *et al.* (1997), usando DNA de diferentes espécies relataram que o aumento da quantidade de DNA polimerase na reação, acarretou um aumento na quantidade de fragmentos amplificados pela técnica, enquanto que aumentando-se a quantidade de “primers”, há um aumento no número de fragmentos de DNA de baixo peso molecular. Subconjuntos diferentes necessitavam de concentrações diferenciadas de magnésio para a ocorrência de intensidade máxima. Sabe-se, também, que a concentração de DNA é de extrema importância: uma baixa concentração pode acarretar baixo número de fragmentos e seu excesso a inexistência destes.

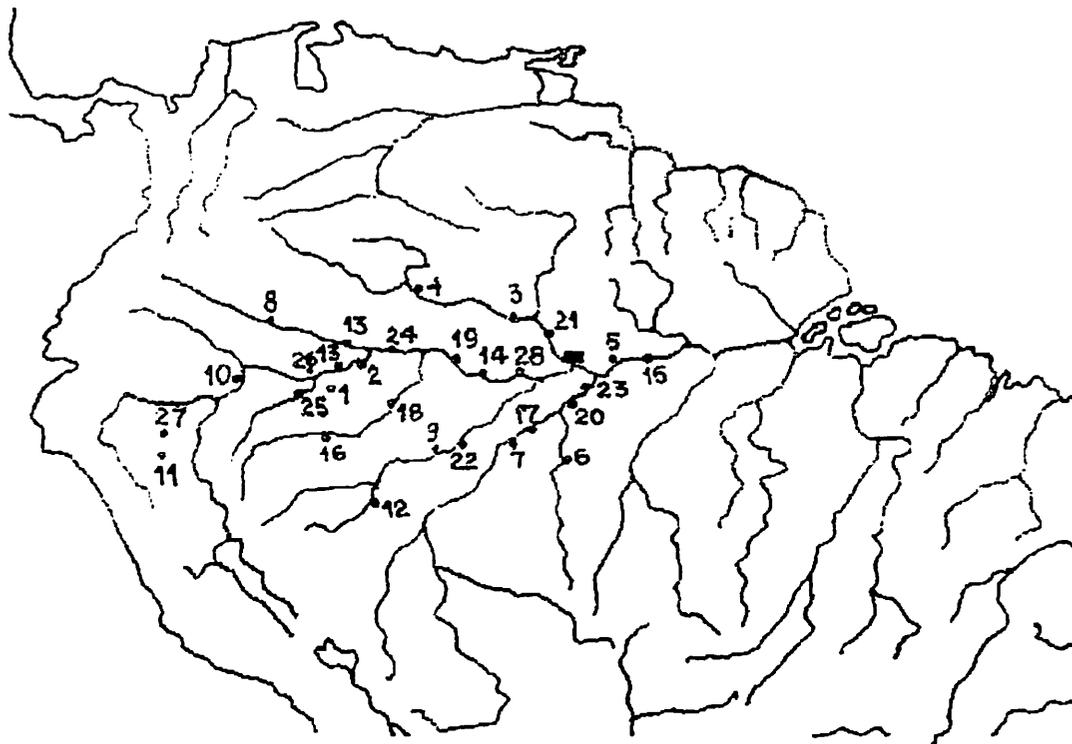
A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutação de ponto) são suficientes para causar a não complementariedade com o sítio de iniciação (“priming site”) e assim impedir a amplificação de um segmento (Williams *et al.*, 1990). É evidente que outras modificações, como deleções ou inserções entre sítios de iniciação adjacentes pode ser considerada fontes de polimorfismo. Deste modo, o polimorfismo de DNA analisado por técnicas de RAPD possui natureza binária, caracterizando-se pela presença ou ausência do segmento de DNA amplificado, que visualizado em gel, denomina-se “banda” (FIGURA 8 e TABELA 1).

O uso concomitante de dois “primers” arbitrários pode ser utilizado para aumentar a quantidade de polimorfismo genético (Welsh & McClland, 1990). Outra alternativa é a utilização de enzimas de restrição após a PCR nos vários segmentos amplificados.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. GERMOPLASMA**

O germoplasma utilizado no experimento foi oriundo de 28 etnovariedades de cubiu, da coleção mantida pelo INPA em Manaus (AM), procedentes de diversas partes da Amazônia brasileira, peruana e colombiana, conforme localização geográfica apresentada na Figura 1.



**Figura 1.** *Solanum sessiliflorum*. Origem e localização geográfica de 28 etnovariedades de cubiu: Brasil: 1. Benjamin Constant/AM; 2. São Paulo de Olivença/AM; 3. Barcelos/AM; 4. São Gabriel da Cachoeira/AM; 5. São Sebastião do Uatumã/AM; 6. Apui/AM; 7. Humaitá/AM; 9. Lábrea/AM; 12. Boca do Acre/AM; 13. Santo Antônio do Içá/AM; 14. Coari/AM; 15. Barreirinha/AM; 16. Eirunepé/AM; 17. Manicoré/AM; 18. Carauari/AM; 19. Tefé/AM; 20. Borba/AM; 21. Novo Airão/AM; 22. Canutama/AM; 23. Autazes/AM; 24. Jutai/AM; 25. Ataláia do Norte/AM e 28. Codajás/AM. Colômbia: 8. Putumayo e 26. Letícia; Peru: 10. Iquitos; 11. Tarapoto e 27. Yurimagua.

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL

O experimento de campo foi realizado na Estação Experimental de Hortaliças "Alejo von der Pahlen" (EEH) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizada

no Km 14 da Rodovia AM 010, em Manaus. O solo dessa área é do tipo Podzólico Vermelho-Amarelo álico, textura arenosa, de baixa fertilidade. O clima local é caracterizado como “Afi” no esquema de Köppen, registrando 2.450 mm de chuva, com uma estação seca, no período de julho a setembro (EMBRAPA, 1982).

### **5.3. SEMEADURA E REPICAGEM**

A semeadura foi feita no mês de março do ano de 2000, utilizando-se bandejas de isopor com solo previamente autoclavado a 120 °C, por duas horas, sendo posteriormente colocadas em casa de vegetação. Trinta dias após a semeadura, realizou-se a repicagem das plântulas para recipientes mais espaçosos, deixando-se somente uma planta por recipiente.

### **5.4. PREPARAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL**

O solo da área experimental foi preparado no início do mês de abril/2000, constando de uma aração e uma gradagem. As covas foram abertas com as seguintes dimensões: 0,20 m de comprimento, por 0,20 m de largura e 0,20 m de profundidade, em um espaçamento de 1,0m entre as covas e 1,5 m entre as fileiras.

### **5.5. ADUBAÇÃO MINERAL E ORGÂNICA**

No ato do plantio foram aplicados em cada cova 2 kg de composto orgânico, 30g de superfosfato triplo, 30 g de cloreto de potássio e 10g de ureia. Aos 15 dias após o transplante fez-se uma adubação em cobertura com 10g de ureia por planta, repetindo-se essa prática até o momento em que as plantas iniciaram a produção de frutos.

### **5.6. TRANSPLANTE E TRATOS CULTURAIS**

O transplante foi realizado no início do mês de maio de 2000. Capinas, adubações complementares, irrigação, controle de doenças e pragas foram adotados sempre que necessários, de acordo com as recomendações de Silva Filho (1998).

### **5.7. COLHEITA**

A colheita dos frutos teve início a partir do mês de novembro de 2000, estendendo-se até o mês de abril de 2001, quando apresentavam a coloração amarela ( ponto ideal de maturação para consumo *in natura* e outros aproveitamentos). Nesse estágio de maturação,

as sementes já estão fisiologicamente maduras e com o percentual de 100 % de vigor de germinação (Silva Filho, 1994). Os frutos foram retirados dos ramos das plantas, cortando seus pedúnculos com tesoura de poda. Depois de retirados da planta, os frutos foram colocados em caixas plásticas com capacidade de 30 kg, para evitar que eles fossem amassados.

## **5.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados com 28 tratamentos (etnovariedades) em quatro repetições. A unidade experimental foi constituída de uma área de 7,5 m<sup>2</sup>, contendo 5 plantas úteis.

## **5.9. AVALIAÇÃO DOS CARACTERES MORFOLÓGICOS NAS ETNOVARIEDADES DE CUBIU.**

As avaliações foram efetuadas no campo (EEH) e nos laboratórios (de Genética e Etnobiologia, da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônômicas (CPCA do INPA), utilizando-se técnicas para estudos de morfologia e anatomia de Solanáceas recomendadas por Alcazar (1981).

### **5.9.1. CARACTERES MORFOLÓGICOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS**

Os estudos morfológicos realizados foram baseados nas evidências de caracteres constantes ou não e nas variedades, e a terminologia adotada foi segundo alguns trabalhos modernos de taxonomia, bem como em vários trabalhos específicos para determinadas estruturas, como (Barroso *et al.*, 1999; Ferri *et al.*, 1981; Hickey, 1973; Lawrence, 1970; Payne, 1978; Radford, 1986; Stern, 1992). Os seguintes órgãos foram observados para as 28 etnovariedades de cubiu:

#### **5.9.1.1. CAULE**

Forma, indumento e cor(es).

#### **5.9.1.2. FOLHA**

Forma, cor (face abaxial e adaxial), tipo de venação, indumento (tipos de pelos, espinhos e estípulas).

#### **5.9.1.3. INFLORESÊNCIA**

Tipo, número de flores

#### 5.9.1.4. FLOR

Tipo da corola (tamanho, número de pétalas e forma), cálice (cor, tipo, número de sépalas, forma das sépalas, indumento/lacínias, posição (interna ou externa), indumento (interno, externo e externo), Androceu (número e tipo de estames), Anteras (forma, sésil ou não), Deiscência (tipo), Gineceu, (posição do ovário, forma, indumento), Lóculos (número), Óvulo (tipo e número).

#### 5.9.1.5. FRUTO

Forma (FF), número de frutos por planta (NF), tamanho (comprimento (CF) e largura (LF)), peso médio (PMF), espessura da polpa (EP), volume de suco na placenta (VS), número de lóculos (NL), peso da casca (PC), peso das sementes úmidas (PS) e indumentos.

Os caracteres quantitativos dos frutos (NF, CF, LF, EP, NL, VS, PMF, PC, PS) foram avaliados com base em cinco plantas úteis de cada parcela. Os dados foram anotados individualmente por planta, correspondendo aos valores médios da contagem do número de frutos, mensurações, e peso dos dez primeiros frutos produzidos pelas plantas de cada parcela, e depois foram calculadas as médias aritméticas.

### **5.10. ANÁLISES QUÍMICAS DAS SEMENTES**

As análises químicas das sementes de cubiu para determinação das lectinas com fins de identificar atividades hemaglutinantes foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação do Professor Dr. Benildo Sousa Cavada, a partir do início da colheita dos frutos, que aconteceu no mês de fevereiro/2001.

#### **5.10.1. PREPARAÇÃO DE FARINHAS**

Sementes retiradas dos frutos das etnovarietades de cubiu, descritas anteriormente, foram trituradas em moinho elétrico do tipo Wiley, acoplado com peneira de 60 mesh, e o material obtido foi repassado em moinho de café (Krups tipo 200). As farinhas obtidas foram estocadas em frascos hermeticamente fechados e mantidos em câmara fria (5 °C) para uso posterior.

### 5.10.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS A DIFERENTES VALORES DE PH

As farinhas das sementes dos diferentes acessos de cubiu foram submetidas a extrações protéicas (1: 10, m/v) com soluções tampões a diferentes valores de pH (tampão Glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6; tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 e; tampão Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0; todas contendo NaCl 0,15 M) por 3 horas sob agitação constante à temperatura ambiente, após o que as suspensões foram centrifugadas a 10.000 x g durante 30 minutos a 4 oC. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em papel de filtro qualitativo e os extratos protéicos resultantes foram utilizados em ensaios de hemaglutinação.

O esquema utilizado para extração de proteínas das farinhas de sementes quiescentes encontra-se na Figura 2.

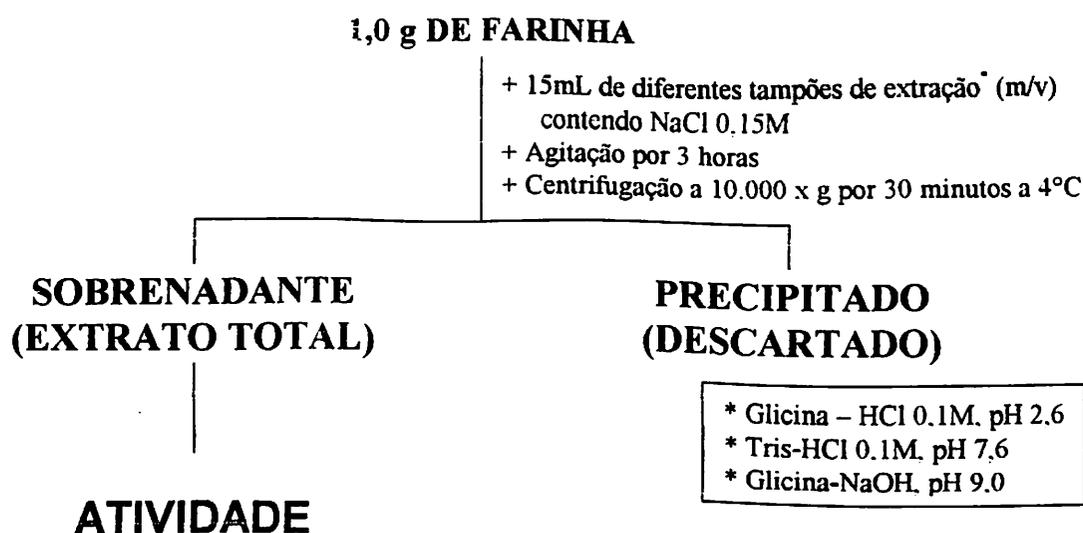


Figura 2. Esquema de extração de proteínas das farinhas de sementes de cubiu (*Solanum sessiflorum*).

### 5.10.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

A determinação de proteínas nos diferentes extratos obedeceu ao método de Bradford (1976). A cada 100 µl de amostra, preparada em diferentes concentrações, foi adicionado 2,5 ml do reagente de Bradford. A mistura, após repouso de 10 minutos foi submetida à verificação de absorvância a 595nm. A concentração de proteínas foi determinada a partir de uma curva padrão usando-se albumina sérica bovina.

#### **5.10.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE**

Para determinação da atividade hemaglutinante e da atividade hemolítica nos diferentes extratos protéicos, foi utilizado o método descrito por Moreira & Perrone (1977). As amostras a serem dosadas foram submetidas a diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8,...), em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6, contendo NaCl 0,15M e, a cada 200  $\mu$ L de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias (humanas do sistema ABO e de coelho) a 2% em NaCl 0,15M.

Os ensaios foram incubados a 37 °C por 30 minutos e deixados em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos, centrifugados a 1000 x g por 30 segundos e interpretados. Em seguida foram deixados por mais 12 horas à temperatura ambiente quando foi feita uma nova leitura. Os títulos de hemaglutinação foram determinados como sendo o inverso da maior diluição de uma determinada concentração de proteína ainda capaz de apresentar aglutinação visível a olho nu. Hemácias humanas do sistema ABO e de coelho foram utilizadas no estado normal e tratadas com enzimas proteolíticas (Bromelaina, Papaína e Tripsina).

As amostras de sangue foram coletadas em recipientes contendo heparina, lavadas por cinco vezes com NaCl 0,15M, centrifugadas (3.000 x g) e submetidas à determinação do hematócrito (concentração de células vermelhas), de acordo com a metodologia descrita por Kabatt & Mayer (1967). Para o tratamento enzimático, hemácias foram suspensas a 2 % em solução contendo a enzima proteolítica (0,1 mg de enzima por 10 mL de NaCl 0,15M), incubadas a 20°C por 1 hora, com agitações ocasionais e, a seguir, lavadas sete vezes com solução salina (NaCl 0,15M) gelada. Após centrifugação (3.000 x g), as células foram ressuspendidas em NaCl 0,15M para uma concentração final de 2 %.

#### **5.10.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS E 2-MERCAPTOETANOL**

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS e 2-mercaptoetanol, foram conduzidos seguindo-se a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de géis de separação em placas (13,8 x 7,9 x 0,11 cm). O gel de aplicação (contendo 3,5 % de poliacrilamida) foi preparado com tampão Tris-HCl 0,5 M,

pH 6,8 e SDS a 1 %. O gel de separação, com 12,5 % de poliacrilamida, será preparado com tampão tris-HCl, pH 8,8 contendo SDS a 1 %.

A farinha das sementes oriundas das diferentes etnovariedades de cubiu (*S. sessiliflorum*), submetida à eletroforese, foi suspensa em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 8,3 contendo SDS a 1 %. A cada suspensão foram adicionados 10 µL de 2-mercaptoetanol, as mesmas serão tratadas a 100 °C por 10 minutos e centrifugadas (centrifuga Eppendorf) por 5 minutos. Azul de Bromofenol (para a marcação da frente da corrida eletroforética) a 0,02 % e cristais de sacarose (para tornar as amostras mais densas) foram acrescentados às amostras antes das mesmas serem aplicadas ao gel.

A corrida eletroforética foi realizada à amperagem constante (15 mA) com uma duração média de 3 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado em TCA (ácido tricloroacético) a 12,5 %, colocado para corar com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05 % preparado em metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8, v/v/v), sendo o descoramento do gel feito com metanol, ácido acético e água (1 : 3,5 : 8, v/v/v).

## **5.11. ANÁLISES QUÍMICAS DOS FRUTOS DE CUBIU**

As análises químicas dos frutos de cubiu para determinação da umidade, fração cinza, proteína, extrato etéreo, fração nifext, energia e de macro e microelementos minerais, foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Físico-Química de Alimentos da Coordenação de Pesquisas de Ciências da Saúde, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus, sob a orientação dos Pesquisadores Dra. Lúcia O. K. Yuyama e Dr. Jaime Paiva de Aguiar, a partir do mês de abril de 2001.

### **5.11.1 PROCESSAMENTO DOS FRUTOS PARA FINS DE ANÁLISE QUÍMICA**

**Coleta e Seleção dos frutos** (foram coletados frutos maduros isentos de cortes, furos e outros defeitos) → **Lavagem** [Os frutos frescos foram lavados por meio de imersão em água potável a temperatura ambiente (27°C)] → **Despoldamento** 1) **descasque manual** (utilizando-se faca de aço inoxidável) 2) **Retirada da placenta contendo sementes e suco da cavidade locular** (utilizando-se faca de aço inoxidável) → **Trituração da polpa** (utilizando um liquidificador elétrico) → **Embalagem da polpa** (utilizando recipientes

plásticos, livres de ar e bem lacrados com máquina de lacrar adequada) → **Congelamento da polpa** (em freezer, a temperatura de 0 °C) → **Liofilização** (operação de remoção da água por sublimação do gelo. A concentração da solução, em termos de sólidos solúveis, maior que 1%, o produto seco terá o mesmo volume da solução, o que permite obter-se produtos de baixa densidade aparente) → **Farinha da polpa de cubiu** (Figura 3).

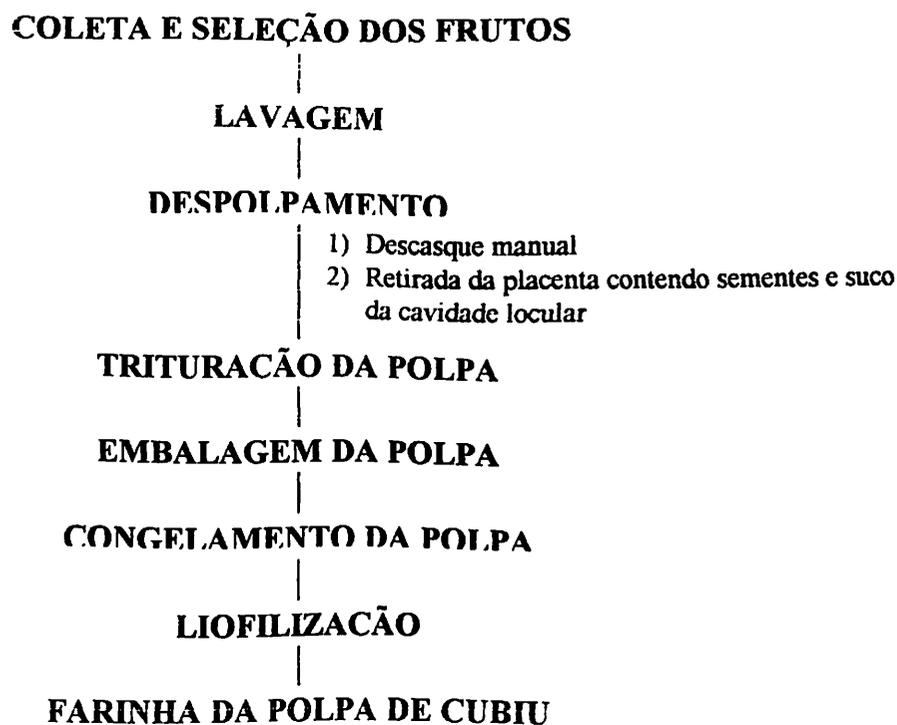


Figura 3. Esquema do processamento dos frutos de cubiu (*Solanum sessiflorum*) para fins de análises químicas.

### 5.11.2. LAVAGEM DA VIDRARIA

A fim de evitar a contaminação por metais, toda vidraria foi mantida em banho de ácido nítrico a 30 % por no mínimo 12 horas, sendo em seguida enxaguada com água desionizada, por no mínimo seis vezes.

### **5.11.3. UMIDADE**

A determinação da umidade foi realizada por meio da liofilização, até o peso constante, seguindo as recomendações de Pitombo (1989).

### **5.11.4. FRAÇÃO CINZA**

O resíduo mineral fixo foi determinado por gravimetria, utilizando mufla a 550° C (AOAC, 1995).

### **5.11.5. PROTEÍNA**

O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl para nitrogênio total, onde o fator 6,25 foi utilizado para conversão em proteína (I.c, 1995).

### **5.11.6. EXTRATO ETÉREO**

A fração extrato etéreo foi determinada em extrator de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo p.a. como solvente (I.c, 1995).

### **5.11.7. FRAÇÃO NIFEXT**

A fração nifext ou fração livre de nitrogênio, foi determinada por diferença após a determinação das frações anteriores e relacionada com o teor de glicídios nos frutos.

### **5.11.8. ENERGIA**

O valor energético preliminar dos frutos foi calculado a partir dos teores das frações protéica, lipídica e glicídica, utilizando-se os teores específicos, que levam em consideração o calor de combustão, 4, 9 e 4 kcal respectivamente, necessitando ainda da quantificação da fibra alimentar.

### **5.11.9. DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS MINERAIS**

O teor dos macro e microelementos minerais foi determinado pelo método de espectrometria de absorção atômica, por meio da leitura direta, em solução de amostras oxidadas a temperatura variando entre 150 °C e 200 °C, por via úmida, solubilizadas com ácido nítrico concentrado e perydiol 30 % ( Merck P.A.) e diluídos em água desionizada, segundo o método preconizado pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985) e Manual PERKIN ELMER de 1985.

A leitura foi realizada diretamente nas soluções diluídas em espectrofotômetro PERKIN ELMER, modelo 1100B, com lâmpada de cátodo oco, calibrado de acordo com as especificações do manual do equipamento para comprimento de ondas e fendas em condições de pressão e fluxo de gases que permitiram obtenção de chama oxidante (ar/acetileno).

Como padrão foi utilizado para cada elemento mineral o tritrisol Merck, diluído em água desionizada e ácido nítrico 2 % nas concentrações especificadas de acordo com o manual do equipamento.

Os resultados obtidos por absorvância foram expressos em mg/100 g da parte comestível do fruto.

Para controle da análise, seguiu-se as recomendações de Cornelis (1992) e Delves (1992), utilizando-se material de referência.

## **5.12. ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA NAS ETNOVARIEDADES POR MEIO DA TÉCNICA RAPD**

### **5.12.1. IDENTIFICAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS**

Folhas jovens de um indivíduo de cada uma das etnovariedades foram colhidas e acondicionadas primeiramente em sacos plásticos para os procedimentos de identificação, descrição morfológica e outras determinações. Partes das amostras foram, então, transportadas ao Laboratório de Citogenética e Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, onde foram lavadas com água destilada e as nervuras separadas do limbo e descartadas. Procedeu-se em seguida a extração de DNA genômico.

### **5.12.2. PURIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO**

O método utilizado foi baseado na utilização do reagente CTAB (brometo de cetil trietilamonio), originalmente descrito por Williams *et al.* (1980).

Para cada tratamento pesou-se 0,6 g do limbo das folhas de cada uma das amostras. A massa foi macerada em gral estéril, em presença de nitrogênio líquido e com um pistilo. O pó obtido foi adicionado, em pequenas quantidades, a tubo falcon contendo 6 ml do tampão

de extração (Tris-HCl 100 mM; pH 8,0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; CTAB 2 % e 2-mercaptoetanol 0,2 %), previamente aquecido a 60 °C.

As amostras foram incubadas a 60 °C por 16 horas e então extraídas com 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico, (25:1, v/v). O tubo foi invertido várias vezes por dez minutos e então centrifugado a 1000 g por 15 minutos em centrífuga NT-811 (Nova Técnica, Brasil) a temperatura ambiente.

O DNA presente na fase aquosa (superior) foi transferido para um tubo falcon limpo e precipitado. O DNA foi precipitado pela adição de 2/3 do volume de isopropanol 100%. Os tubos foram deixados em repouso por aproximadamente 24 horas. Os precipitados foram ressuspensos em 2 ml NaCl 1 M e precipitados novamente por 24 horas pela adição de 2,5 volumes de etanol 100%.

Os precipitados foram então lavados com etanol 70 % (1 ml por 10 minutos) ressuspensos em 2 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e armazenados a uma temperatura de 4 °C, para uso posterior.

A concentração do DNA das várias amostras foi estimada a partir dos valores de absorvância a 260nm ( $A_{260}$ ), determinados de soluções 1:10 (em TE) usando-se espectrofotômetro Gene Quant DNA/RNA calculator (Pharmacia Biotec, Suécia). A razão  $A_{260}/A_{280}$  foi usada como parâmetro para se estimar a pureza de cada preparação (Sambrook *et al.*, 1989).

### **5.12.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,7% (M/V), pH 8,0**

A eletroforese de DNA em gel de agarose foi realizada segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Resumidamente, pequena quantidade de agarose 1,2g foi adicionada a 200ml de tampão TBE (Tris-Ácido Bórico 0,045 M, EDTA 0,001 M). Após ser completamente fundida, a mistura foi resfriada a 60 °C e o brometo de etídio adicionado, a partir de uma solução estoque de 10 mg/ml, em água (Pharmacia Biotech), de maneira que sua concentração final foi de 0,25 µg/ml. O gel permaneceu em repouso em temperatura ambiente até a sua completa solidificação, 30 a 40 minutos.

As amostras a serem submetidas à corrida eletroforética foram previamente diluídas com 20% do seu volume com uma solução de azul de bromofenol 0,25 % (m/v), glicerol 30 % (v/v), preparada em tampão TE, nas concentrações anteriormente citadas. O gel foi submerso em tampão TBE, com o brometo de etídio na concentração final anteriormente citada. As amostras foram, então, aplicadas ao gel e a corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V, fornecida pela fonte Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia Biotech. A voltagem foi desligada, encerrando-se a corrida quando o azul de bromofenol visualizado percorresse mais de 2/3 do comprimento do gel. O gel foi levado para um transluminador de raios ultravioleta – UV (MicorVue™ transluminator, Pharmacia Biotech) e o DNA observado pela fluorescência do brometo de etídio quando exposto aos raios UV. O gel foi fotografado com uma máquina Polaróide acoplada a um “Hood” de 0,7x usando-se filme “instant film black e White” (Fuji Film, Japão).

#### 5.12.4. REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE UTILIZANDO “PRIMERS” ARBITRÁRIOS 10-MER

Os fragmentos necessários para as análises genéticas foram obtidos por PCR usando-se como substrato o DNA genômico das etnovariedades em estudo, isolados de folhas jovens e com “primers”, oligonucleotídeos, sintetizados com 10 nucleotídeos de seqüência arbitrária. Os “primers” foram obtidos da Operon Technologies (USA) e foi utilizado o “kit” denominado de “F”. Os oligonucleotídeos foram diluídos para uma concentração de cinco pmoles. Foram usados sete primers, cujas seqüências são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6. Seqüência de nucleotídeos dos primers utilizados nas reações RAPD em etnovariedades de cubiu.

“Primers”	Seqüência (5’ para 3’)
OPF-4	GGT GAT CAG G
OPF-5	CCG AAT TCC C
OPF-6	GGG AAT TCG G
OPF-7	CCG ATA TCC C
OPF -8	GGG ATA TCG G
OPF -9	CCA AGC TTC C
OPF -10	GGA AGC TTG G

FONTE: Operon Technologies. A – Adenina, G – Guanina, C – Citosina e T – Timina.

As misturas dos reagentes para a PCR foram realizadas em tubos de 0,2 ml, específicos para PCR, da Axygen Scientific (USA). As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 25 µl contendo Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dATP, dCTP, dGTP e dTTP 100 µM cada um, Oligonucleotídeo 5 pmoles e 0,5 U Taq DNA polimerase (Pharmacia Biotech, Suécia).

A cada tubo foi acrescentada uma quantidade de 20 a 30 ng de DNA e acrescentado um volume de água estéril para se obter um volume final de 25 µl por reação. Foi acrescentado, além das amostras testadas, um tubo que continha todos os elementos citados com exceção de DNA, para controle negativo da reação.

As reações de amplificação foram realizadas usando-se um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., USA). O programa utilizado, com as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão estão relacionadas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições térmicas utilizadas nas reações de RAPD, nas etnovarietades de cubiu (*S. sessiliflorum*).

Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Primeiro Ciclo	Desnaturação	94	3
	Anelamento	37	1
	Extensão	72	2
Do 2° ao 43° Ciclos	Desnaturação	94	1
	Anelamento	37	1
	Extensão	72	2
Último Ciclo	Desnaturação	94	1
	Anelamento	37	1
	Extensão	72	10

#### 5.12.5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2,0% (M/V), PH 8,0

Para a visualização dos resultados da PCR foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2,0 % com brometo de etídio (0,25 µg/ml), como descrito anteriormente. A corrida eletroforética foi realizada a voltagem constante de 100 V.

Para cada "primer" utilizado, o perfil de bandas obtido foi registrado na forma de matriz, na qual a presença ou ausência de cada fragmento recebeu valores 1 ou 0, respectivamente.

## **5.13. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS**

### **5.13.1. ANÁLISES DE VARIÂNCIAS**

Análises de variâncias dos caracteres quantitativos físicos e químicos foram aplicadas para a avaliação dos frutos (Número de Frutos, Comprimento do Fruto, Largura do Fruto, Peso Médio do Fruto, Espessura da Polpa, Peso da Casca, Peso das Sementes, Volume do Suco, Número de Lóculos, Umidade, Fibras, Cinzas, Proteínas, Lipídios, Potássio, Zinco, Manganês, Sódio, Ferro, Magnésio e Cálcio) serviram para determinar as diferenças existentes entre as 28 etnovariiedades, conforme o modelo matemático preconizado por Steel & Torrie (1960). As análises de variâncias foram complementadas pelo teste de comparação múltiplas de médias (teste de Tukey), ao nível de 5 % de probabilidade.

### **5.13.2. ESTIMATIVAS DAS CORRELAÇÕES ENTRE OS CARACTERES FÍSICOS E QUÍMICOS**

As correlações entre caracteres físicos e químicos nas etnovariiedades foram estimadas a partir das estimativas das covariâncias, com base na metodologia recomendada por Falconer (1981).

### **5.13.3. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DOS DADOS GERADOS PELA TÉCNICA RAPD**

Os dados obtidos na matriz binária foram analisados com programas de inferência filogenética FREE TREE, obtido a partir do URL <http://www.natur.cuni.cz/~flegr/freetree.htm>. O programa utiliza os dados binários para calcular os coeficientes de similaridade e de dissimilaridade, ou distância genética por diversos coeficientes. Estes dados são utilizados em análises de agrupamento e conseqüentemente na construção de dendrogramas. O referido programa disponibiliza uma função de análise de "bootstrap" ou de "jackknife" que utiliza estudos estatísticos para dar sustentabilidade à(s) árvore(s) encontrada(s) (Cruz, 1990)

Foram utilizados os seguintes coeficientes de similaridade genética: o de Nei e Li - Dice ( $S_{NL}$ ) e o de Jaccard ( $S_J$ ), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$S_{NL} = \frac{2a}{2a + b + c} \qquad S_J = \frac{a}{a + b + c}$$

a = presença da banda em ambas as populações (número de contagens de concordância do tipo 1 1);

b = presença de banda na população A e ausência em B (número de contagens de discordância do tipo 1 0);

c = ausência de banda na população A e presença em B (número de contagens de discordância do tipo 0 1);

d = ausência de banda em ambas as populações (número de contagens de concordância do tipo 0 0).

Os valores dos coeficientes variam de 0 a 1. O Valor 1 indica que os dois perfis de DNA comparados são idênticos, enquanto que o valor 0 indica que não existe similaridade entre os indivíduos.

Os valores dos coeficientes de similaridade foram convertidos em valores de dissimilaridade ou distância genética ( $D_{ij}$ ), onde  $D_{ij} = 1 - S_{ij}$ . Na construção das árvores filogenéticas, foi utilizado o método UPGMA com análise de "bootstrap" com 1000 contagens repetitivas. As árvores geradas foram visualizadas com o programa TREEVIEW.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS QUALITATIVAS DAS ETNOVARIEDADES DO CUBIU

Na caracterização dos descritores morfológicos das 28 etnovariedades do cubiu (*S. sessiliflorum*) observou-se que, geralmente, o hábito da planta varia em altura, dependendo do genótipo, entre 0,50 m e 2,0 m (Silva Filho, 1994). O caule em geral é cilíndrico, e mede entre 2,1 - 5,9 cm de diâmetro (dependendo muito da condição ambiental onde a planta se desenvolve) apresentando pêlos simples e estrelados em geral sesseis, com 5 - 7 pontas

(Silva Filho, 1994). Na fase inicial de crescimento a planta descreve forma arqueada ou ereta, ramificando-se facilmente próximo do nível do solo (Figura 4). Estas características são comuns em muitas Solanáceas, e especialmente, em espécies do gênero *Solanum* (Whalen *et al.*, 1981).

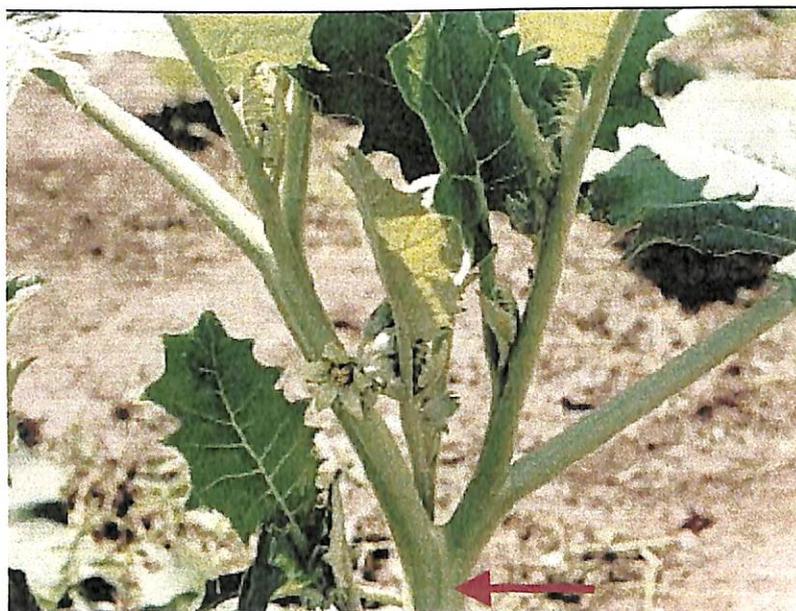


Figura 4. Detalhe do caule de uma planta de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) mostrando o início da ramificação.

As lâminas das folhas das plantas das 28 etnovariedades variam de 45 - 58 cm de comprimento na maturidade, são largamente ovais, repandas, de base truncada, freqüentemente assimétricas com 5 - 7 nervuras laterais, proeminentes nas duas faces (com espinhos na var. *georgicum* ETN 18), espiraladas, em fascículos de três nos nós, longo-pecioladas; pecíolos 14 - 15 cm de comprimento; margens lobado-denteadas, os dentes largos, deltóides; serícea, com pubescência de pêlos simples, e estrelados com um ponto central de onde divergem as ramificações ou raios (Figura 5); os raios laterais, 5 - 7 mm de comprimento; nervuras densamente cobertas de pêlos estrelados, os raios laterais bem desenvolvidos partindo de um ponto central; superfície abaxial densamente cinéreo-pubescente, pêlos estrelados, curto-pecicelados; pecíolos relativamente curtos, 1/10 a 1/4 do comprimento da lâmina, estrelado-pubescentes.

De acordo com Whalen *et al.* (1981), as folhas das espécies da Seção Lasiocarpa, estão entre as maiores encontradas no gênero *Solanum*, com lâminas que podem ultrapassar 0,50 m de comprimento.



Figura 5. Detalhe da folha de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal).



Figura 6. Detalhe da inflorescência de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal).

Inflorescências/flores. As inflorescências (Figura 6) são cimas axilares, ou pseudo-axilares, curtas, 3 - 10 mm de comprimento, com 6 - 16 flores, as mais inferiores, 2 - 5 flores

perfeitas, estrelado pubescentes; pedicelos 2 - 7 mm de comprimento; cálice verde, largamente campanulado, 2 - 3,5 mm de comprimento, 5 - 8 mm de largura, externamente estrelado-pubescente; lobos do cálice ovais a largamente ovais, agudos no ápice, 8 - 14 mm de comprimento todos com nervura proeminente; corola branca ou esverdeada, estrelado-rotácea, 1,8 - 2,8 cm de diâmetro, dividida quase até a base em lacínias em geral de dois tipos: ovais ou ovado-lanceoladas, com o ápice em forma de capuz, externamente estrelado-pubescentes, internamente glabras; lacínias somente na ETN 18 de um só tipo, anteras lanceoladas a linear-lanceoladas, ligeiramente coniventes, 6,5 - 9,5 mm de comprimento, freqüentemente fracamente curvadas no ápice; o par superior de anteras freqüentemente maior do que as três anteras mais inferiores; estilete glabro, 8 - 11 mm de comprimento nas flores perfeitas, mais reduzidos ou atrofiados nas flores estaminadas. Este mecanismo é conhecido como enantiostilia ou enantiomorfia, que de acordo com Weberling (1989) facilita a polinização cruzada (Figura 7).



Figura 7. Detalhe da flor de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal).

Os frutos das 28 ETNs apresentaram nove diferentes fenótipos (Figura 8). Segundo Barroso *et al.* (1999), são classificadas como baga ou solanídio; infrutescência com 1-8 frutos globosos, ovóides, piriformes ou cilíndricos, quando jovens, densamente estrelado-pubescentes (os pêlos decíduos deixam as bagas perfeitamente glabras ainda na pré-maturação); pêlos 0,4 - 1(2) mm de comprimento, curto-pedicelados com 15 - 50 raios

laterais de 0,1 - 0,8(1,5) mm de comprimento; vermelho-alaranjados, vermelhos ou amarelos, quando maduros.

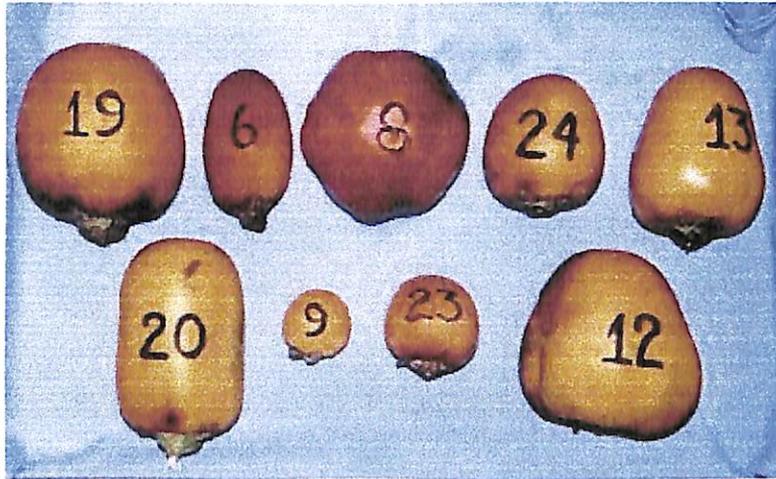


Figura 8. Variação morfológica de frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) agrupando-se em nove fenótipos apresentados por 28 etnovariedades.

Cerca de 46,4 % das etnovariedades produziram frutos de forma globosa, variando no tamanho desde pequeno a grande. Os frutos globosos e ovalados são maiores, chegando a ultrapassar 300 g.

De posse da ampla variabilidade encontrada no fenótipo dos frutos, Silva Filho *et al.* (1996) recomendaram que em programa de melhoramento do cubiu, a forma globosa seria ideal para seleção de frutos para o aproveitamento na agroindústria indústria, tendo em vista a maior facilidade de despulpá-los mecanicamente. Por outro lado, na indústria caseira, a forma do fruto teria menos importância do que na agroindústria, por tratar-se de uma atividade, até certo ponto, artesanal. Sementes numerosas por fruto (1000 sementes pesam 1 g), lenticulares, amarelas, largamente ovais, discóides a reniformes, 3,2 - 4,0 mm de comprimento (Figura 9), testa lisa e endosperma duro; margens espessadas; embrião curvo, cilíndrico. Germinação fanerocotiledonar, cotilédones ovóides, inteiros, penínervos, longo-peciolados. Eófilos alternos, sem estípulas.

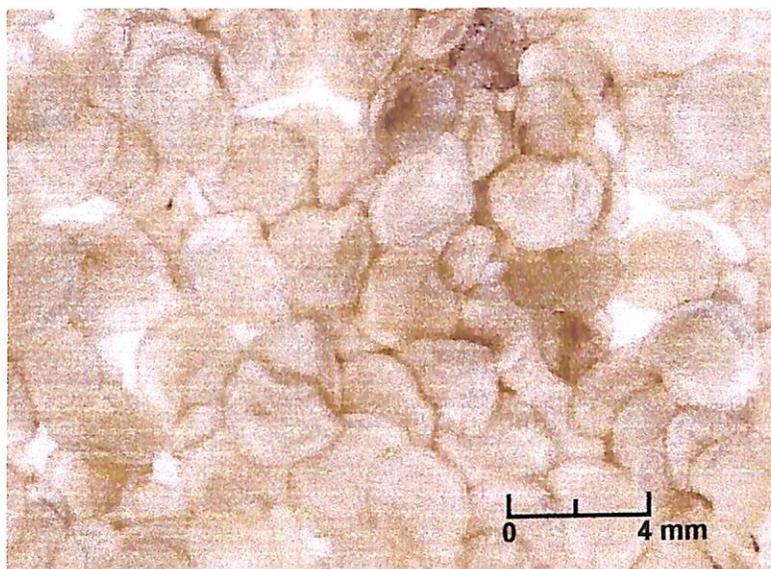


Figura 9. Detalhe das sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal).

## **6.2. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS QUANTITATIVAS DAS ETNOVARIEDADES DE CUBIU**

As análises de variância detectaram diferenças significativas entre as etnovariedades para todos os caracteres morfológicos e químicos estudados nos frutos. Os coeficientes de variação estimados para os caracteres da composição elementar mínima, foram os mais baixos (1,01 a 1,25 %); os caracteres dimensionais e químicos, oscilaram na faixa de 1,12 % a 20,5 %. A predominância de valores tendendo para os menores percentuais (abaixo de 10 % em um experimento) indicam uma boa precisão experimental.

### **6.2.1. DESCRITORES MORFOMÉTRICOS DOS FRUTOS DE CUBIU AVALIADOS EM 28 ETNOVARIEDADES DA AMAZÔNIA**

No tocante aos descritores dimensionais (Tabela 8), observou-se que no comprimento, os frutos variaram de 3,1 a 9,2 cm; na largura, 3,3 a 7,5 cm e, quanto a espessura da polpa, de 1,5 a 19,5 mm. A maioria das etnovariedades produziram frutos pequenos a médios. Os maiores frutos foram produzidos pelas ETN's 28, 12 e 3, originárias de Codajás, Estirão do Equador e de Barcelos, respectivamente.

Tabela 8. Valores médios de caracteres morfológicos quantitativos avaliados em etnovariedades de cubiu (*S. sessiliflorum*). INPA/Manaus, 2001/2002.

ETN	NF	CF (cm)	LF (cm)	PMF (g)	EP (mm)	PS (g)	PC (g)	NL	VS (ml)
01	4.0 o	6.1 i	5.7 ef	216.7c	11.9 f	19.1 a	17.7 d	6.0 b	25.7 n
02	17.7 cfgh	6.2 i	5.5 fg	82.3 k	8.2 i	9.9 g	7.8 k	6.0 b	28.2 m
03	5.7 no	5.7 kl	7.3 c	174.7 c	13.1 d	7.2 k	11.5 fgh	6.0 b	33.5 k
04	14.7 ghijk	7.4 f	4.4 k	85.7 j	5.1 m	5.9 mn	7.4 klm	4.0 c	24.2 op
05	7.0 mno	8.2 d	5.6 efg	251.0 b	12.9 de	4.7 p	12.2 fg	4.0 c	21.6 q
06	12.3 ijkl	8.1 d	5.4 fgh	149. f	3.7 o	5.1 o	14.5 e	4.0 c	36.1 h
07	10.7 klmn	9.1 b	4.4 k	95.0 i	2.0 q	3.8 r	12.8 f	4.0 c	30.4 l
08	16.0 fghij	5.8 jk	6.3 d	150.0 f	7.1 j	12.9 c	9.4 ij	4.0 c	39.8 g
09	22.7 de	5.2 no	5.0 ij	55.0 p	5.7 l	8.1 i	5.8 n	4.0 c	21.4 q
10	20.0 ef	5.3 mn	4.7 jk	64.7 o	2.7 p	5.3 o	5.8 n	6.0 b	23.5 p
11	10.0 klmn	5.1 op	5.1 hi	75.0 m	6.1 l	4.3 q	5.5 n	4.0 c	20.4 r
12	8.0 lmno	8.4 c	8.7 A	300.0 a	14.1 c	10.0 g	19.1 cd	4.0 c	58.6 b
13	12.7 hijkl	8.2 d	5.5 fg	150.0 f	11.7 fg	2.8 s	11.1 gh	4.0 c	30.2 l
14	35.7 c	5.6 l	5.3 ghi	74.5 m	4.7 mn	12.5 d	7.6 kl	6.0 b	35.1 ij
15	20.0 ef	4.9 q	5.3 ghi	70.6 n	6.0 l	9.0 h	6.3 lmn	4.0 c	24.6 o
16	35.7 c	5.3 mn	5.9 e	78.7 l	3.0 p	6.1 m	10.5 hi	4.0 c	34.5 j
17	13.0 hijkl	6.4 h	6.3 d	122.7 g	11.3 g	7.8 j	11.0 gh	6.0 b	27.8 m
18	17.3 fghi	5.0 pq	5.0 ij	76.0 m	4.9 mn	4.8 p	8.3 jk	4.0 c	23.7 p
19	8.0 lmno	9.2 ab	7.7 b	251.7 b	1.5 r	10.5 f	20.4 bc	6.0 b	62.0 a
20	52.3 b	3.1 r	3.4 l	18.5 q	1.8 qr	6.6 l	0.8 o	4.0 c	8.1 s
21	14.7 ghijk	5.1 op	5.3 ghi	81.8 k	6.6 k	9.2 h	6.0 mn	4.0 c	25.5 n
22	18.0 efg	5.4 m	5.4 fgh	76.7 lm	4.5 n	10.4 f	7.7 kl	6.0 b	24.8 o
23	12.0 jklm	6.7 g	7.7 a	94.5 i	16.5 b	16.1 b	17.9 d	9.0 a	54.5 c
24	25.7 d	5.9 j	5.7 ef	97.7 h	5.8 l	9.9 g	7.8 k	4.0 c	35.6 hi
25	15.0 ghijk	6.5 h	6.4 d	121.0 g	9.6 h	15.9 b	12.6 f	6.0 b	46.5 e
26	89.3 a	3.2 r	3.3 l	20.2 q	0.8 s	4.6 p	1.4 o	4.0 c	6.8 t
27	11.3 jklm	7.6 e	7.5 bc	207.0 d	12.5 e	5.7 n	24.1 a	4.0 c	50.7 d
28	9.0 lmno	9.3 a	7.6 bc	301.0 a	19.5 a	11.5 e	21.6 b	4.7 c	40.7 f

Nas colunas, as médias seguidas pelas mesmas letras não difrem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ETN = Etnovariedades, NF = número de frutos, CF = comprimento do fruto, LF = largura do fruto, PMF = peso médio do fruto, EP = espessura da polpa, PS = peso das sementes, PC = peso da casca, NL = número de lóculos, VS = quantidade de suco.

A tendência do surgimento de um percentual significativo de frutos pequenos está relacionada com a manutenção de plantas com frutos desse porte pelas populações tradicionais da Amazônia que os utilizam na preparação de sucos e/ou para substituir o limão, quando em falta. Este percentual menor de etnovariedades que produzem frutos de maior tamanho (acima de 200 g), está relacionado aos processos de domesticação e seleção praticados pelos índios e caboclos da Amazônia Ocidental ao longo dos anos.

Há algumas décadas, os maiores frutos de cubiu eram encontrados, quase que exclusivamente na região do Alto Solimões, em territórios brasileiro, peruano e colombiano. Uma observação feita por Silva Filho (1994) revela que o intercâmbio entre as pessoas viajantes fez com que estes frutos fossem levados do seu centro de diversidade na Amazônia Ocidental, para outras regiões geograficamente distintas, em tempo recente.

Proporcionalmente, a espessura da polpa varia de acordo com o tamanho do fruto. As três características dimensionais demonstram uma forte estabilidade fenotípica. Isto é importante para programa de melhoramento do cubiu, porque é muito fácil praticar a seleção de frutos para quaisquer finalidades agroindustriais, baseando-se no seu tamanho.

O rendimento estimado com base no número médio de frutos (NMF) e no peso médio dos frutos/planta (PMF), discrimina claramente as etnovariedades de cubiu (Tabela 8). A magnitude de variação média de NMF foi de 4 a 89 frutos/planta e para o PMF de 18,5 a 301 g. Quando se comparam estes resultados com aqueles obtidos por Pahlen (1977) e Silva Filho (1998), observa-se que sempre em testes iniciais, a performance em produtividade em populações de cubiu (mesmo dentro do estado do Amazonas), em ambiente diferente, é baixa. A partir do uso de genótipos descendentes das plantas introduzidas, as gerações futuras manifestam ganhos em produtividade de até 75 %, em número de frutos. O caráter PMF em cubiu sempre demonstra estabilidade fenotípica (Silva Filho *et al.*, 1999).

Quanto ao caráter número de lóculos (NL) por fruto (Tabela 8), as etnovariedades também apresentaram divergências genéticas, variando de 4 - 9 lóculos. Sendo que a maior frequência foi de etnovariedades com frutos de 4 lóculos (64,3 %), seguida de outras com 6 lóculos (32,1 %) e com 9 lóculos (3,6 %). Para Silva Filho (1994) o número de lóculos nos frutos de cubiu, está relacionado com a influência que podem causar na largura e firmeza dos frutos. Os frutos com 4 lóculos apresentam padrão mais uniforme, com superfície lisa e saliências menos aparentes, conferindo-lhe maior resistência ao transporte à longas distâncias (Silva Filho, 1998).

Os descritores, peso da casca (PC), peso da semente (PS) e volume de suco da cavidade locular variaram de 0,8 a 24,1 g, 4,3 a 19,1 g e 21,6 a 62,0 ml, respectivamente. Esses descritores também discriminam as etnovariedades de cubiu estudadas. Esperava-se

que os valores médios destas três características fossem proporcionais ao tamanho do fruto, entretanto isso não foi confirmado (Tabela 8). Uma sugestão que pode explicar o fato pode estar relacionada com o espaço que a placenta ocupa no interior de cada fruto.

### **6.2.2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR EM FRUTOS DE 28 ETNOVARIEDADES DE CUBIU**

Com base nos dados referentes à composição mínima da polpa dos frutos das 28 etnovariedades de cubiu analisadas, no presente estudo (Tabela 9), observa-se que os valores médios dos teores de umidade dos frutos variando de 86,7 a 93,5 %, de cinzas entre 6,2 a 12 %, de proteína bruta entre 2,3 e 9,2 %, de lipídios entre 1,3 a 27,2 % e de carboidratos, entre 58,5 e 87,3 %, respectivamente, discriminam amplamente o material genético pesquisado.

O teor de umidade dos frutos das etnovariedades de cubiu demonstra que não há uma relevante relação entre o tamanho do fruto e o teor de umidade. Os dados obtidos experimentalmente por Silva Filho (1994) na Zona da Mata do Estado de Pernambuco e, Silva Filho *et al.* (1997 e 1999) em solos de várzea e de terra firme do estado do Amazonas, apresentam teor de umidade dos frutos sempre em torno de 86 a 93 %.

A variabilidade genética em concentração de cinza (resíduo mineral fixo), também é notória na polpa das ETNs de cubiu (Tabela 9). Os teores de cinza encontrados na literatura oscilam numa faixa de 6,0 a 12 na maioria das hortaliças e frutas consumidas no Brasil. Na verdade, o caráter cinza não tem uma importância muito relevante para fins de melhoramento de qualquer espécie vegetal, porque as análises feitas em alimentos ou em quaisquer outras substâncias, só auxiliam na determinação dos minerais que eles contêm.

Com relação ao percentual de proteína analisado na polpa do cubiu, verificou-se um fato interessante: o menor valor (2,3 %) registrado nos frutos da ETN 13, procedente de Santo Antônio do Içá, é superior aos valores do teor de proteína encontrado na polpa de todas as espécies cultivadas da família Solanácea de maior importância comercial, tais como a batata inglesa (1,0 %), tomate (1,0 %), pimentão (1,3 %) e berinjela (1,1 %). A ETN 11, originária de Tarapoto (Amazônia Peruana), apresentou teor de 9,2 % de proteína, cujo valor é superior aos encontrados em um grande número de hortaliças e frutas mais

consumidas no mundo. Já que as proteínas são um alimento essencial em qualquer fase do crescimento do homem e que entre as suas principais funções biológicas estão a constituição da cromatina nuclear, a construção e reparação das células que formam os tecidos animais e vegetais (Balbach & Boarim, 1992), o cubiu, por meio de melhoramento genético, poderá incrementar os valores do seu teor de proteína para ser utilizado em prol da qualidade alimentar das populações humanas carentes da Amazônia.

Tabela 9. Composição mínima dos frutos das diferentes etnovariiedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum*).

Etnovariiedade	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)*	Lípidios (%)	Carboidratos (%)**
ETN 1	93.2abc	6.3 h	6.7 e	1.3 r	85.7ab
ETN 2	87.1fg	8.1 def	4.2 k	4.8 i	82.4cdefg
ETN 3	93.4abc	6.8 gh	5.8 f	1.9 pq	85.4abcd
ETN 4	92.4abc	6.4 h	7.6 d	2.6 no	84.6abcde
ETN 5	93.7a	6.8 gh	6.7 e	1.5 r	85.4abcd
ETN 6	92.5abc	8.6 cde	4.4 hijk	15.9 b	71.3k
ETN 7	92.7abc	6.6 h	5.3 g	2.7 mn	85.2abcd
ETN 8	91.5abc	8.6 cde	8.3 c	5.8 g	77.2ij
ETN 9	86.9g	12.3 a	6.5 e	2.3 op	78.9hij
ETN 10	91.5cdef	8.4 de	8.4 c	6.9 f	76.3j
ETN 11	90.9abcde	6.5 h	9.2 a	5.1 hi	79.1ghij
ETN 12	93.3abc	6.3 h	8.3 c	4.3 j	81.1cdefg
ETN 13	93.1abc	6.1 h	2.3 l	8.9 d	82.7bcdef
ETN 14	90.6abcde	8.6 cd	4.5 hijk	8.5 e	78.6hij
ETN 15	91.2abcde	9.4 b	4.4 hijk	4.4 j	81.4efgh
ETN 16	89.1defg	7.4 fg	4.3 ijk	10.7 c	77.7ij
ETN 17	90.8abcde	6.8 gh	8.9 ab	2.1 p	82.4defg
ETN 18	91.8abcde	8.2 def	6.144 f	4.2 j	81.6efgh
ETN 19	91.6abcd	6.4 h	4.6 h	1.6 qr	87.3a
ETN 20	86.7g	8.4 de	6.4 e	4.3 j	80.6fghi
ETN 21	91.2abcd	9.5 b	4.3 hijk	27.2 a	58.5l
ETN 22	92.3abc	9.4 b	4.6 hi	5.4 h	80.5fghi
ETN 23	88.2efg	9.3 bc	8.6 bc	10.5 c	71.7k
ETN 24	90.0bcde	7.8 cf	5.9 f	5.4 h	80.7fghi
ETN 25	93.4ab	7.4 fg	4.3 jk	3.2 lm	85.5abcd
ETN26	92.6abc	8.6 cd	5.4 g	3.2 l	82.7bcdef
ETN 27	92.6abc	6.9 gh	7.6 d	3.6 k	81.6efgh
ETN 28	93.5abc	6.8 gh	4.6 hij	2.8 mn	85.8abc

Nas colunas, as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\* Nitrogênio total (Kjeldhal) X 6.12

\*\* Obtido por diferença

Quanto ao conteúdo de lipídios (Tabela 9), o maior percentual dessa substância, foi encontrado na polpa dos frutos da ETN 21 (27,2 %), procedente de Novo Airão, região do Baixo Rio Negro. Assim como aconteceu com o teor de proteínas, o cubiu também é superior em concentração de lipídios ao tomate, pimentão, berinjela e batata. Por outro lado, sabe-se que sob muitos aspectos os lipídios são vitais para o desenvolvimento das plantas e dos animais porque são fontes concentradas de energia e retirada dos alimentos. A literatura registra que o mesmo peso de lipídios corresponde ao dobro das calorias provenientes de proteínas e carboidratos. Também são valiosos como solventes (substâncias em que podem ser dissolvidas) para as vitaminas A, B, E e K), que são insolúveis em água (Tucker, 1993). A variabilidade genética apresentada para essa característica, demonstra que as etnovariedades de cubiu testadas neste experimento, também podem ser discriminadas com base no seu conteúdo de lipídio e como indicador de um caráter bioquímico que poderá ser explorado em programas de melhoramento da espécie.

Assim como as proteínas e os lipídios, os carboidratos, fazem parte dessa classe de alimentos essenciais aos animais e às plantas. Na caracterização das etnovariedades pesquisadas (Tabela 3), a variação no conteúdo de carboidratos, também demonstra uma nítida divergência genética. A ETN 19, procedente de Tefé, com o percentual de 87,3 %, foi a que apresentou o maior conteúdo de carboidratos. Geralmente, as hortaliças que produzem frutos apresentam valores muito baixos em percentuais desse alimento. Entre as Solanáceas, nem a batata inglesa supera o cubiu em teores de carboidratos. Já que os carboidratos fornecem aos seres vivos a maior parte da energia requerida para o funcionamento dos músculos e dos nervos, constituição e recomposição dos tecidos vegetais e animais (Van Buren, 1979), o cubiu também pode ser considerado um alimento importante na dieta alimentar de pessoas que praticam exercícios, principalmente, aqueles relacionados com o enrijecimento dos músculos para o ganho de massa corporal, pelos praticantes de exercícios aeróbicos.

### **6.2.3. CONTEÚDO DE MACRO E MICROELEMENTOS DETERMINADOS EM FRUTOS DE 28 ETNOVARIEDADES DE CUBIU**

Uma análise exclusiva para cada elemento contido na polpa de cubiu (Tabela 10) demonstra que entre os minerais analisados o potássio destacou-se em termos de

concentração, nas 28 etnovariedades avaliadas. A amplitude de variação deste elemento foi de 54,6 a 463,5mg nas etnovariedades ETN3 e ETN9, originárias de Barcelos e Lábrea (AM), respectivamente.

Tabela 10. Teores médios de macro e micro-elementos na composição química dos frutos das 28 etnovariedades de cubiu da Amazônia. Manaus/2002.

ETN	K (mg)	Zn (µg)	Mn (µg)	Na (µg)	Fe (µg)	Mg	Ca (µg)
1	164.4hij	264.3efghi	0.01f	0.02k	108.0fg	11.6efg	5.9fghi
2	375.2b	306.3efg	0.09a	0.40bcd	268.3abcde	17.9c	13.7ab
3	54.6k	105.0lmn	0.02cdef	0.07jk	97.3g	4.3h	4.1i
4	210.8defgh	327.3cdef	0.01f	0.35bcde	157.0efg	12.7efg	7.5efgi
5	187.2ghi	154.3klm	0.02cdef	0.16hijk	196.7cdefg	13.4cdefg	6.4fghi
6	239.2cdefg	313.0defg	0.05bc	0.07jk	288.3abcd	13.5cdefg	8.6efgh
7	189.9fgh	235.3ghijk	0.03cdef	0.15hijk	212.0bcdef	12.9defg	6.9efghi
8	253.9cde	427.0b	0.09cdef	0.19ijk	165.7efg	14.4cdef	6.1fghi
9	563.5a	623.7 <sup>a</sup>	0.03cdef	0.41bc	352.7a	32.6a	13.1 <sup>a</sup> bc
10	237.4defg	124.0lm	0.05cde	0.41bc	200.3cdefg	14.5cdef	5.8ghi
11	245.4cdefg	403.7bc	0.03cdef	0.27bcdefgh	296.7abc	17.9c	7.1efghi
12	147.9hij	103.3lmn	0.01f	0.29bcdefgh	290.7abc	10.1fg	9.3cdefgh
13	124.5ij	27.0n	0.02cdef	0.25defghi	194.3cdefg	10.4efg	6.1fghi
14	300.9c	437.3b	0.02cdef	0.30bcdefg	242.0abcde	13.5cdefg	7.5efghi
15	251.1cdef	78.3mn	0.04cde	0.32bcdef	175.0defg	15.1cde	7.6efghi
16	267.3cd	245.3fghij	0.02cdef	0.43b	334.3a	17.7cd	10.5bcde
17	204.0efgh	230.7ghijk	0.03cdef	0.03k	241.7abcde	11.5efg	9.7cdefg
18	261.7cde	394.0bcd	0.01f	0.24efghi	255.3abcde	12.1efg	9.4cdefg
19	227.4defg	177.7ijkl	0.02cdef	0.04jk	204.3bcdefg	14.4cdef	8.9defgh
20	387.8b	216.0hijk	0.08ab	0.61a	260.0abcde	25.2b	17.0a
21	237.3defg	174.3jkl	0.01f	0.29bcdefgh	209.0bcdefg	11.0efg	8.5efgh
22	265.7cde	401.0bc	0.03cdef	0.23efghi	200.3cdefg	10.6efg	6.2fghi
23	384.8b	232.0ghijk	0.05bcde	0.36bcde	220.0bcdef	18.3c	9.8bcdef
24	237.6defg	286.3efgh	0.08a	0.19fghij	315.0ab	13.5cdefg	12.6bcd
25	186.4ghi	336.0cde	0.02cdef	0.15ghijk	187.3cdefg	10.6cfg	5.4hi
26	205.6defgh	211.3hijk	0.01f	0.06jk	161.7cfg	11.4cfg	6.8cfghi
27	187.2ghi	178.0ijkl	0.02cdef	0.16ghijk	196.7cdefg	13.4cdefg	6.4fghi
28	113.9jk	111.7lmn	0.02cdef	0.27cdefgh	123.0fg	8.9gh	4.5i

Nas colunas as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente em nível de 5% pelo teste de Tukey.

ETN = Etnovariedades, K = potássio, Zn = zinco, Mn = manganês, Na = sódio, Fe = ferro, Mg = magnésio, Ca = cálcio.

O potássio é um elemento largamente distribuído nos alimentos, porque é um dos principais constituintes essenciais das células vegetais (Yuyama *et al.*, 1997). Estes valores encontrados nas etnovariedades de cubiu são superiores aos analisados em tomate, pimentão, berinjela, batata e em outros frutos muito consumidos na Amazônia tais como: graviola, cupuaçu, araçá boi, pupunha, manga, abricó, entre outros

Quanto à concentração de zinco em frutos de cubiu, as análises mostraram uma variação de 27,0 a 623,7  $\mu\text{g}$  nas etnovariedades ETN13 e ETN9 originárias de Santo Antônio do Içá e Lábrea (AM), respectivamente. Várias etnovariedades apresentaram teores desse elemento, superiores a 400  $\mu\text{g}$ . Ao comparar o teor de zinco encontrado nos frutos de cubiu com outros registrados em análises de diversos alimentos de origem vegetal (RDA, 1990) o cubiu pode ser considerado uma boa fonte desse elemento. Pesquisadores que estudaram a dieta alimentar da população de Manaus (Shrimpton & Giugliano, 1979, Yuyama *et al.*, 1992) relataram que o zinco é um fator limitante. Portanto, o cubiu pode ser uma fonte disponível desse elemento que está ao alcance de qualquer família que desejar utilizá-lo.

Entre os microelementos determinados nos frutos de cubiu, o manganês foi encontrado em menor quantidade, mas discriminou as etnovariedades. Entre o material genético testado, as etnovariedades ETN9, ETN8 e ETN20 foram as que apresentaram maiores concentrações de manganês (0,09  $\mu\text{g}$ , 0,09  $\mu\text{g}$  e 0,08  $\mu\text{g}$ ), respectivamente. Geralmente frutas e hortaliças são boas fontes de manganês, entretanto, a sua presença nesses alimentos, depende da disponibilidade desse elemento no solo (Yuyama *et al.*, 1997).

Dentre os minerais mais consumidos pelos animais, o sódio se destaca. Mas, o conteúdo desse elemento nestas etnovariedades estudadas é baixo. A ETN20, originária de Borba (AM), foi a que apresentou maior concentração deste elemento (0,61  $\mu\text{g}$ ).

Entre os micro-elementos analisados nessas etnovariedades de cubiu, o ferro foi o que ocorreu em maior concentração. A amplitude de variação desse elemento nos frutos das etnovariedades foi de 97,3 a 352  $\mu\text{g}$ . Destacou-se como mais rica em ferro, a ETN3, originária de Barcelos (AM).

A Amazônia brasileira e o nordeste do Brasil são as regiões do trópico úmido mundial caracterizadas pela deficiência nutricional principalmente em vitamina A, Fe e Zn. Para amenizar esse desequilíbrio nutricional nessas populações, a utilização do cubiu apresenta-se como uma alternativa viável. Além do mais, outras fontes importantes de ferro também são fartamente encontradas na Amazônia. Por exemplo, o arroz, a pupunha, o caroço da jaca e o cupuaçu, que concentram teores expressivos de ferro (Yuyama *et al.*,

1997). Para estes pesquisadores, a dificuldade de muitas pessoas em suprir as necessidades nutricionais é notória como verificado nas pesquisas realizadas na Amazônia. Isto porque nem todo o ferro presente nos alimentos, em especial proveniente de vegetais é absorvido e utilizado pelo organismo. Portanto, necessitando de mais estudos sobre a disponibilidade do ferro em dietas mistas, cujos ingredientes são consumidos em diferentes proporções e de maneira não uniforme em cada refeição. Além das diferenças entre o ferro hemínico e não hemínico, a biodisponibilidade do ferro não hemínico é fortemente influenciada por vários componentes da dieta. Dessa forma, a absorção do ferro não hemínico aumenta em presença de carnes e ácidos ascórbico. Portanto, a utilização do camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.), fruto que ocorre abundantemente na Amazônia (uma fonte rica em ácido ascórbico), pode ser utilizado para tornar o ferro de origem vegetal biodisponível.

O teor de magnésio variou nas etnovariedades estudadas de 4,3 a 32,6 mg. A etnovariedade ETN9 procedente de Borba (AM), foi a que se destacou, com maior concentração desse elemento. Esses valores determinados nos frutos de cubiu, são considerados baixos quando comparado com outros vegetais que concentram teores acima de 1000 mg (amêndoas, bananas, favas, entre outras). Entretanto, em comparação com o tomate, pimentão, beringela e a batata inglesa, que são espécies mais consumidas dentro da família Solanácea, o cubiu é a fonte de alimento mais rica, neste elemento.

O conteúdo de cálcio presente nos frutos de cubiu variou de 4,1 a 17,0 mg. A ETN20, procedente de Borba foi considerada a fonte mais rica desse elemento nas 28 etnovariedades pesquisadas. Quando comparado com os teores de cálcio concentrados no tomate, pimentão, berinjela, batata inglesa, e outras hortaliças e frutas da Amazônia, os frutos de cubiu apresentam valores muito bons. Esse fato é importante registrar, porque o cálcio, de todos os sais minerais indispensáveis ao organismo humano desempenha funções importantíssimas. Entre elas destaca-se a coagulação do sangue, a contribuição para manter o equilíbrio do ferro e o maior aproveitamento do fósforo no organismo e tem ação de defesa contra as infecções (Tucker, 1993). Entretanto, o cálcio contido nos alimentos é apenas parcialmente absorvido, porque o grau de absorção e fixação depende de vários fatores. Um exemplo importante é aquele em que pode encontrar-se em combinações diversas, formando oxalatos de cálcio, que sendo insolúvel, praticamente, impede a absorção

do cálcio. Nessa categoria está o cálcio do espinafre, que tem causado muitos males às pessoas com tendência à formação de cálculos renais (Tucker, l.c.). Na presença de ácidos e gorduras, vitaminas D e C essas substâncias favorecem a absorção e fixação do cálcio. Entretanto, a perfeita assimilação do cálcio se faz na presença de uma cota equilibrada de fósforo (Tucker, l.c.).

#### **6.2.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM EXTRATOS PROTÉICOS A PARTIR DE FARINHAS DE SEMENTES DE CUBIU DA AMAZÔNIA**

A Tabela 11 apresenta os resultados da atividade hemaglutinante em farinhas obtidas das diferentes etnovariedades avaliadas no presente estudo. Constatou-se que nenhum dos extratos protéicos obtidos a diferentes valores de pH (2,6; 7,6 e; 9,0), a partir das farinhas das referidas etnovariedades, apresentaram atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho e humana, do sistema ABO, mesmo quando as mesmas foram tratadas com enzimas proteolíticas.

Embora a família Solanaceae já tenha se tornado uma fonte de lectinas interessantes, como a lectina dos tubérculos da batata, *Solanum tuberosum* (Allen & Neuberger, 1973), da polpa do tomate, *Lycopersicon esculentum* (Lambrechts *et al.*, 1984), e das sementes da zabumba, *Datura stramonium* (Crowley & Goldstein, 1981), nas condições utilizadas no presente estudo, os extratos protéicos das sementes de cubiu não apresentaram atividade hemaglutinante. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade destas sementes apresentarem lectinas, sendo necessário estudos mais aprofundados com relação a outros tipos de hemácias.

Tabela 11. Levantamento da atividade hemaglutinante em diferentes extratos protéicos de farinha de cubiu (*Solanum sessiliflorum*)\* da Amazônia.

ETN	PH						UH/mgP				
							Hemacias	Humana A	Humana B	Humana O	Coelho
1	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A**	S.A	S.A	S.A	S.A
2	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
3	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
4	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
5	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
6	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
7	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
8	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
9	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
10	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
11	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
12	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
13	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
14	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
15	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
16	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
17	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
18	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
19	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
20	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
21	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
22	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
23	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
24	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
25	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
26	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
27	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
28	2,6	7,6	9,0	2,6	7,6	9,0	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A

\* Resultados em UH/mgP (atividade hemaglutinante específica) obtidos após 30 minutos e após 12 horas de ensaio: \*\* Sem atividade hemaglutinante.

### 6.3. ESTIMATIVA DOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÕES FENOTÍPICAS ( $r_F$ ), GENOTÍPICAS ( $r_G$ ) E AMBIENTAL ( $r_A$ )

Ao analisar a Tabela 12, verificou-se que na maioria dos casos, os pares de caracteres morfológicos e químicos avaliados, apresentaram coeficientes de correlações fenotípicas e genotípicas com os mesmos sinais e níveis semelhantes de significâncias. Observou-se, também, que na maioria dos casos, as correlações fenotípicas foram ligeiramente superiores às genotípicas e que a somatória das duas, foi sempre superior que as correlações de ambiente. Aproximadamente 91 % dos coeficientes de correlação genotípica e fenotípica foram estatisticamente em nível de 1 % de probabilidade, de acordo com a tabela apresentada por Fisher & Yates (1968).

Tabela 12. Estimativa dos coeficientes de correlação (r) fenotípica (F), genética (G) e ambiental (A), entre caracteres morfológicos e químicos em frutos de cubiu. Manaus, 2002.

	r	EP	PMF	LF	CF	PS	PC	VS	TU	LIP	CIN	PRO	K	Zn	Mn	Na	Fe	Mg	Ca
NL	F	0.759	0.676	0.913	0.860	0.809	0.787	0.823	0.942	0.551	0.881	0.843	0.732	0.655	0.369	0.639	0.781	0.743	0.818
	G	0.757	0.676	0.910	0.856	0.805	0.782	0.819	0.942	0.554	0.881	0.856	0.730	0.655	0.364	0.632	0.784	0.741	0.814
	A	0.889	0.999	0.996	0.997	0.998	0.979	0.999	0.977	0.877	0.912	0.985	0.862	0.736	0.458	0.110	0.701	0.857	0.019
EP	F		0.899	0.848	0.747	0.678	0.804	0.730	0.756	0.260	0.619	0.702	0.412	0.345	0.134	0.351	0.550	0.476	0.612
	G		0.892	0.847	0.746	0.672	0.801	0.728	0.755	0.261	0.616	0.702	0.410	0.344	0.260	0.350	0.550	0.470	0.611
	A		0.892	0.892	0.756	0.892	0.871	0.898	0.877	0.757	0.861	0.855	0.755	0.645	0.079	0.066	0.670	0.659	-0.038
PMF	F			0.839	0.813	0.664	0.926	0.830	0.734	0.362	0.572	0.688	0.341	0.307	0.253	0.272	0.547	0.422	0.530
	G			0.834	0.807	0.662	0.911	0.812	0.729	0.362	0.566	0.687	0.331	0.303	0.249	0.277	0.542	0.411	0.545
	A			0.996	0.997	0.999	0.991	0.999	0.975	0.876	0.912	0.984	0.861	0.733	0.049	0.109	0.699	0.836	0.001
LF	F				0.946	0.777	0.894	0.951	0.956	0.587	0.887	0.867	0.690	0.614	0.349	0.630	0.838	0.736	0.832
	G				0.912	0.777	0.894	0.951	0.956	0.584	0.914	0.983	0.663	0.739	0.357	0.345	0.828	0.751	0.841
	A				0.949	0.958	0.979	0.962	0.968	0.874	0.914	0.983	0.853	0.739	0.539	0.115	0.998	0.805	0.002
CF	F					0.658	0.903	0.894	0.945	0.605	0.834	0.819	0.674	0.674	0.448	0.598	0.821	0.730	0.802
	G					0.660	0.785	0.739	0.767	0.359	0.739	0.701	0.619	0.616	0.371	0.436	0.569	0.622	0.675
	A					0.997	0.915	0.998	0.967	0.879	0.911	0.983	0.867	0.726	0.542	0.129	0.701	0.838	0.018
PS	F						0.734	0.738	0.750	0.358	0.733	0.703	0.635	0.636	0.196	0.429	0.567	0.626	0.662
	G						0.731	0.734	0.746	0.359	0.731	0.708	0.617	0.637	0.371	0.436	0.569	0.622	0.675
	A						0.980	0.998	0.968	0.876	0.912	0.980	0.857	0.736	0.050	0.116	0.696	0.835	0.042
PC	F							0.898	0.839	0.528	0.694	0.724	0.484	0.450	0.387	0.374	0.690	0.550	0.675
	G							0.894	0.839	0.536	0.692	0.726	0.477	0.450	0.446	0.385	0.692	0.544	0.701
	A							0.877	0.950	0.856	0.902	0.963	0.867	0.710	0.524	0.104	0.682	0.814	0.006
VS	F								0.987	0.639	0.801	0.804	0.620	0.560	0.388	0.589	0.803	0.651	0.764
	G								0.887	0.657	0.804	0.801	0.618	0.555	0.752	0.511	0.810	0.648	0.795
	A								0.976	0.877	0.911	0.985	0.859	0.728	0.475	0.112	0.700	0.834	-0.002
TU	F									0.633	0.934	0.885	0.779	0.706	0.393	0.706	0.872	0.822	0.872
	G									0.636	0.936	0.883	0.778	0.707	0.401	0.711	0.879	0.822	0.888
	A									0.855	0.888	0.969	0.851	0.713	0.002	0.105	0.659	0.816	0.012
LIP	F										0.639	0.402	0.532	0.461	0.737	0.538	0.704	0.539	0.597
	G										0.641	0.402	0.534	0.461	0.738	0.544	0.713	0.541	0.603
	A										0.841	0.863	0.778	0.717	-0.185	0.167	0.599	0.796	0.055
CIN	F											0.813	0.917	0.807	0.441	0.759	0.898	0.924	0.909
	G											0.812	0.919	0.808	0.862	0.772	0.905	0.927	0.924
	A											0.911	0.794	0.743	-0.339	0.085	0.636	0.753	0.105
PRO	F												0.692	0.704	0.248	0.586	0.777	0.745	0.757
	G												0.692	0.704	0.271	0.594	0.776	0.745	0.767
	A												0.851	0.741	0.062	0.131	0.711	0.832	-0.002
K	F													0.891	0.377	0.799	0.885	0.976	0.915
	G													0.894	0.728	0.810	0.893	0.978	0.927
	A													0.631	0.023	0.256	0.616	0.840	0.118
Zn	F														0.325	0.582	0.780	0.857	0.787
	G														0.682	0.590	0.789	0.861	0.797
	A														0.385	0.101	0.488	0.685	-0.009
Mn	F															0.157	0.456	0.352	0.432
	G															0.306	0.834	0.683	0.789
	A															0.002	0.198	0.009	0.228
Na	F																0.794	0.806	0.796
	G																0.817	0.822	0.809
	A																0.016	0.094	0.204
Fe	F																	0.907	0.942
	G																	0.914	0.965
	A																	0.656	0.851
Mg	F																		0.906
	G																		0.918
	A																		0.260

NL = número de lóculos; EP = Espessura da polpa; PMF = Peso médio do fruto; LF = Largura do fruto; CF = Comprimento do fruto; PS = Peso da semente; PC = Peso da casca; VS = Volume do suco; TU = Teor de umidade; LIP = Lipídeo; CIN = Cinza; PRO = Proteína; K = Potássio; ZN = Zinco; Mn = Manganês; Na = Sódio; Fe = Ferro; Mg = Magnésio; Ca = Cálcio.

Normalmente, em programa de melhoramento vegetal, o melhorista pratica seleção simultânea para vários caracteres correlacionados entre si, baseando-se no sinal e magnitude da correlação genotípica. Portanto, na interpretação dessa pesquisa, maior ênfase será dada às correlações genotípicas, por assumirem valor prático na estratégia de melhoramento futuro do cubiu.

A combinação entre os pares de caracteres morfológicos, espessura da polpa (EP), número de lóculos (NL), peso médio do fruto (PMF), largura do fruto (LF), comprimento do fruto (CF), peso da semente (PS), peso da casca (PC) e volume de suco (VS), permitem selecionar, sem problemas, genótipos para o melhoramento do cubiu. O menor e maior valores de coeficientes de correlação genética foram observados, respectivamente, entre CF e PS ( $r_G$  0,660\*\*) e LF e VS ( $r_G$  0,962\*\*).

De uma maneira geral, por meio da combinação entre caracteres morfológicos e químicos, parece factível, selecionar genótipos importantes para o melhoramento do cubiu. Os caracteres EP e PMF são os que apresentam menores valores de coeficientes de correlações genotípicas entre pelo menos seis dos dez elementos minerais testados nesta pesquisa. Por outro lado, o caráter número de lóculos revela uma ampla capacidade de combinação quando forma os pares com todos os elementos químicos. A menor e mais elevada correlação formada entre pares com o caráter NL, observou-se entre NL e LIP ( $r_G$  0,567\*) e NL e CIN ( $r_G$  0,889\*\*).

De maneira geral, por meio das combinações formadas exclusivamente entre os pares dos elementos lipídio (LIP), cinza (CIN), proteína (PRO), potássio (K), zinco (Zn), manganês (Mn), sódio (Na), ferro (Fe), magnésio (Mg) e cálcio (Ca), na sua maioria, é possível selecionar, simultaneamente, importantes elementos químicos que tornarão o cubiu mais rico para a nutrição humana.

O elemento Mn é o que apresenta menor viabilidade de seleção de outros elementos por seu intermédio. Talvez seja uma pena, porque este micronutriente é muito importante como fator de crescimento e na reprodução humana (Van Guren, 1979).

Entre os componentes químicos mais importantes, a PRO, o Fe, o Mg, e o Ca, apresentam fortes correlações genéticas entre si. Além do mais, permitem que ao serem selecionadas individualmente, estejam sendo selecionados simultaneamente outros elementos que contribuirão com o melhoramento do cubiu para fins alimentar. Esta afirmação pode ser assegurada, pelos valores dos coeficientes de correlações genéticas encontrados entre PRO e Fe, PRO e Mg e PRO e Ca ( $r_G$  0,786\*\*,  $r_G$  0,754\*\* e  $r_G$  0,768\*\*, respectivamente), considerados altos.

O cálcio foi o elemento químico que mais se destacou entre todos os elementos que fizeram parte desta pesquisa. Isto porque, por meio de sua seleção será possível que outros caracteres morfológicos e químicos desejáveis ao melhoramento do cubiu para dieta alimentar humana, sejam selecionados, simultaneamente.

Um fato importante que deve ser mencionado com relação ao elemento Ca, é que de todos os elementos ele tem sido o mais estudado entre as diversas frutas, porque está associado à parede celular, formando ligações entre os resíduos de ácido galacturônico de cadeias pécnicas adjacentes, constituindo o complexo cálcio-pectina que tem sido responsabilizado pela firmeza dos tecidos (Tucker, 1993).

Outro comentário relevante sobre a combinação de outros elementos no melhoramento do cubiu é com relação a concentração dos elementos Ca, Mg, Na, e K. Neste estudo, estes elementos formam pares com fortes correlações genéticas (Ca e Mg  $r_G$ = 0,918\*\* e Na e K  $r_G$ = 0,810\*\*, respectivamente). Isto quer dizer que, normalmente, o aumento nas concentrações Ca e Mg melhoram a firmeza, enquanto o aumento nas concentrações de Na e P tem duplo efeito, porque melhora a textura pela redução eletrostática de grupos ácidos, mas tem efeito oposto, pela composição com o cálcio (Van Guren, 1979). Este assunto poderia ser explorado por especialistas em bioquímica, até porque, a atividade enzimática também está relacionada a co-fatores minerais, que além da importância na composição do valor nutritivo das frutas, pode controlar diversos processos bioquímicos, em especial as enzimas (Teixeira *et al.*, 2001).

## **6.4. VARIABILIDADE GENÉTICA DO CUBIU AVALIADA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES**

### **6.4.1. EXTRAÇÃO DO DNA GÊNOMICO**

Vários autores têm descrito metodologias de extração e purificação de DNA, mas, devido a peculiaridades bioquímicas de cada espécie, frequentemente estas técnicas têm sido modificadas. A PCR é uma técnica rápida e simples, porém, requer DNA de alta qualidade para que haja amplificação da(s) seqüência(s) alvo. Portanto, para estudos de marcadores moleculares, a qualidade do DNA é de extrema importância devido às modificações e/ou degradações que o DNA poderá sofrer durante a sua extração (Mnoney *et al.*, 1997).

As concentrações de DNA genômico das etnovarietades do cubiu, extraído com reagente CTAB, utilizando variações na concentração de NaCl no tampão e no agente de precipitação, estimadas pela absorvância a 260 nm, foram bastante variáveis. Foram obtidos valores em que o mínimo apresentou-se em 73,0 µg/ml o máximo em 494,0 µg/ml. O DNA genômico extraído apresentou um fragmento de aproximadamente 23 kb sem degradação aparente e livre de contaminação por RNA. Todas as amostras apresentaram graus de pureza satisfatórios, quando mensurados pela relação  $A_{260}/A_{280}$  (Tabela 13).

De acordo com Sambrook *et al.* (1989), a razão  $A_{260}/A_{280}$  deve ser maior que 1,75. Isto indica que a amostra está relativamente livre de contaminação. Os valores da razão obtidos com as diferentes amostras de cubiu variaram entre 1,85 e 2,28 (Tabela 13), indicando que o DNA purificado possui pequena contaminação com proteínas e que, a metodologia pode ser considerada eficiente e adequada para as análises genéticas propostas.

Tabela 13. Concentração do DNA genômico de 26 etnovarietades de cubiu (*S. sessiliflorum*) extraído com reagente CTAB, utilizando variações na concentração de NaCl no tampão de extração e no reagente de precipitação.

Etnovarietades	A <sub>260mm</sub>	A <sub>280mm</sub>	A <sub>260mm</sub> /A <sub>280mm</sub>	Concentração (ng/μl)*
01	0.263	0.134	1.963	131.9
03	0.354	0.183	1.934	177.0
04	0.610	0.328	1.860	305.0
05	0.174	0.078	2.231	87.0
06	0.344	0.171	2.011	172.0
07	0.211	0.099	2.131	105.5
08	0.180	0.080	2.250	90.0
09	0.643	0.340	1.891	321.5
10	0.894	0.477	1.874	447.0
11	0.988	0.528	1.871	494.0
12	0.674	0.364	1.852	337.0
13	0.416	0.214	1.944	208.0
14	0.585	0.302	1.937	292.5
15	0.805	0.427	1.885	402.5
16	0.343	0.171	2.006	171.5
17	0.615	0.320	1.922	307.5
18	0.326	0.166	1.964	163.0
19	0.359	0.183	1.962	179.5
20	0.396	0.202	1.960	198.0
21	0.471	0.244	1.930	235.5
22	0.413	0.212	1.948	206.5
23	0.293	0.144	2.035	146.5
24	0.266	0.132	2.015	133.0
25	0.640	0.336	1.905	320.0
26	0.292	0.146	2.000	146.0
27	0.146	0.064	2.289	73.0

\* Concentração de DNA calculada com a utilização de  $C_{(ng/\mu l)} = 50 \cdot A_{260mm}$

#### 6.4.2. REPRODUTIBILIDADE DA REAÇÃO DE RAPD

Todas as reações realizadas apresentaram bandas definidas de alta fidelidade e repetitividade (Figura 10). Dos sete *primers* utilizados, apenas OPF-08 não foi capaz de detectar polimorfismo no DNA das amostras em estudo. No geral, foram detectados 59 fragmentos de DNA amplificados, sendo 14 pelo OPF – 05 (Tabela 14, Figuras 11 e 12). Dos 59 fragmentos detectados pelos *primers* utilizados, 28 são polimórficos (Tabela 14).

Os coeficientes de similaridades ( $S_{ij}$ ), calculados pelo modelo matemático de (1972), a partir dos dados binários, tiveram uma variação de 0,819 entre ETN 1 e ETN 16, a 0,988 ETN 3 e ETN 25, enquanto os coeficientes de similaridades calculados a partir do modelo

matemático proposto por Jaccard (1901) tiveram variação de 0,694 entre ETN 1 e ETN 16, e de 0,976 entre ETN 3 e ETN 25.

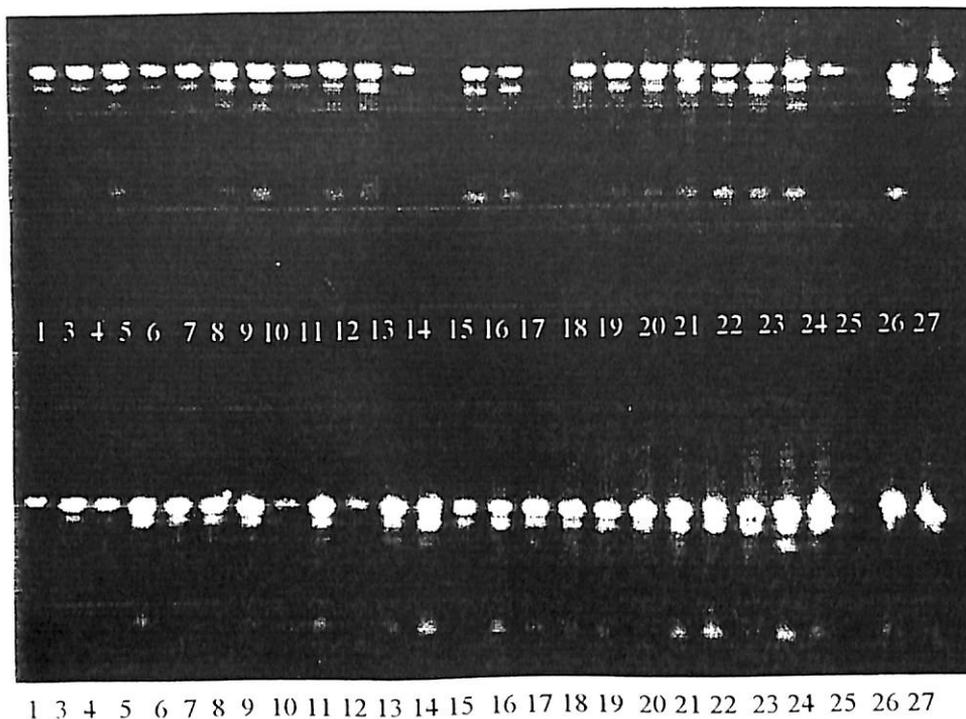


Figura 10. Perfis de RAPD em gel de agarose 2,0 % corado com brometo de etídio, obtido pela amplificação do DNA gênomico de diferentes etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum*), utilizando o primer OPF-10, evidenciando a fidelidade e repetitividade dos resultados.

Tabela 14. Tipo e número de bandas detectadas por *primer* nas reações entre 26 etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum*).

Primer	Número de Bandas Monomórficas	Número de Bandas Polimórficas	Total de Bandas
OPF - 04	04	07	11
OPF - 05	03	11	14
OPF - 06	04	05	09
OPF - 07	05	02	07
OPF - 08	05	00	05
OPF - 09	02	02	04
OPF - 10	08	01	09
Total	31	28	59

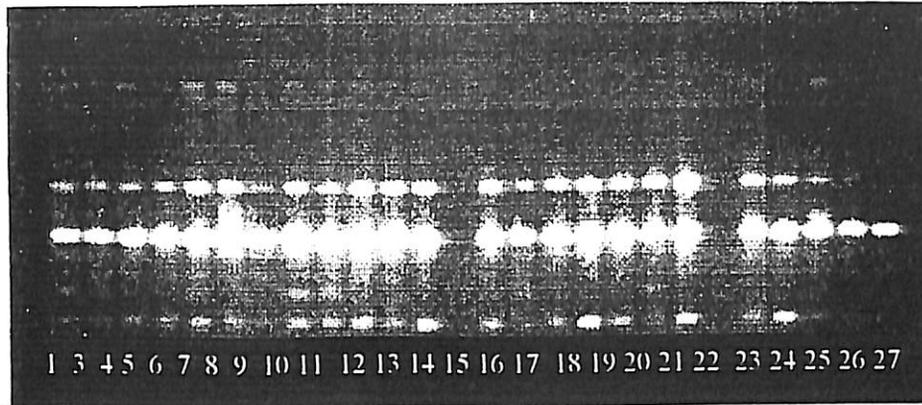


Figura 11. Perfis de RAPD em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio, obtido pela amplificação do DNA gênomico de diferentes etnovariedades de cubiu (*S. sessiliflorum*), utilizando o primer OPF-06, evidenciando a fidelidade e repetitividade dos resultados.

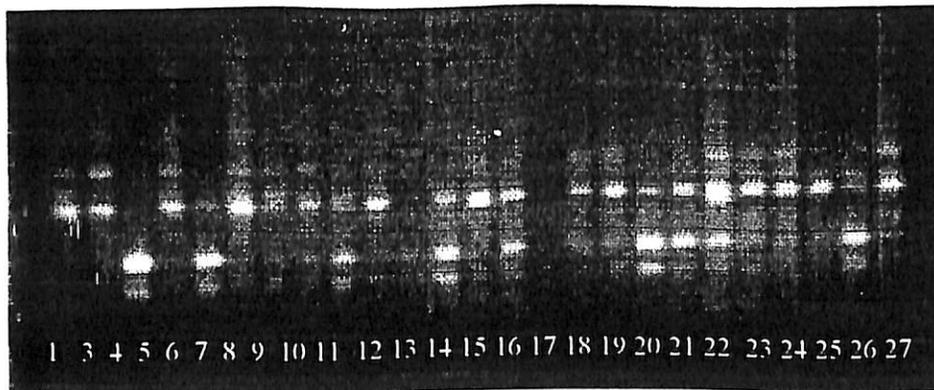


Figura 12. Perfis de RAPD em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio, obtido pela amplificação do DNA gênomico de diferentes etnovariedades de cubiu (*S. sessiliflorum*), utilizando o primer OPF-05, evidenciando a fidelidade e repetitividade dos resultados.

O dendrograma baseado nos coeficientes de similaridades de Jaccard (1901) formou nitidamente três grupos: o grupo I constou de uma única etnovarietade originária de Benjamin Constant (AM), que se juntou aos demais grupos, a uma similaridade variando de 0,693 a 0,820; o grupo II conteve sete etnovarietades formando um sub-grupo das originárias de diferentes municípios do Amazonas, (Humaitá, São Sebastião do Uatumã, Barcelos) e Leticia (Colômbia), e o outro sub-grupo com as ETNs de Canutama, Novo Airão e Autazes (AM). Os menores e maiores valores de similaridades (0,864 e 0,998) foram observados entre as ETNs de Novo Airão e Autazes e, entre Barcelos e Leticia, respectivamente; o grupo III reuniu o maior número de ETNs estudadas (69,2 %). Cinquenta por cento dos seus representantes são procedentes de locais situados ao longo da bacia do Amazonas, entre o Médio e o Alto Solimões. Neste grupo, foram observados cinco sub-grupos: no sub-grupo 1, a ETN procedente de Putumayo (Colômbia) fica isolada das demais por um valor de similaridade que varia de 0,750 a 0,900; o sub-grupo 2, é formado pelas ETNs de Eirunepé, Jutai, São Gabriel da Cachoeira, Apuí (AM) e Yurimagua (Peru); o sub-grupo 3 é constituído pelas ETNs de Lábrea e Manicoré (AM). O sub-grupo 4 foi representado exclusivamente pela ETN de Santo Antônio do Içá (AM), que se juntou aos demais subgrupos a uma similaridade variando de 0,729 a 0,928; o sub-grupo 5 conteve as ETNs de Carauari, Borba e Atalaia do Norte (AM) e, o sub-grupo 6, as ETNs de Tefé, Boca do Acre, Coari, Barreirinha (AM), Iquitos e Tarapoto (Peru).

A análise do dendrograma baseado nas similaridades de Jaccard (Figura 13) mostra pequena consistência no suporte de cada nó do dendrograma, o que sugere uma alta similaridade molecular entre os grupos, e que pode ser mais facilmente explicado, aceitando-se a hipótese de que isto tenha acontecido em função do intercâmbio havido nos últimos tempos e a expansão do cultivo do cubiu na Amazônia. Um fato importante que pode fortalecer essa hipótese está bem claro na composição do sub-grupo 5, formado pelas ETNs procedentes de Carauari, Borba e Atalaia do Norte. Geograficamente, elas estão separadas por longas distâncias em três bacias hidrográficas distintas (Juruá, Madeira e Javary, respectivamente). Entretanto, os valores de similaridades que as uniram, são altos (0,963, 0,962 e 0,974, respectivamente).

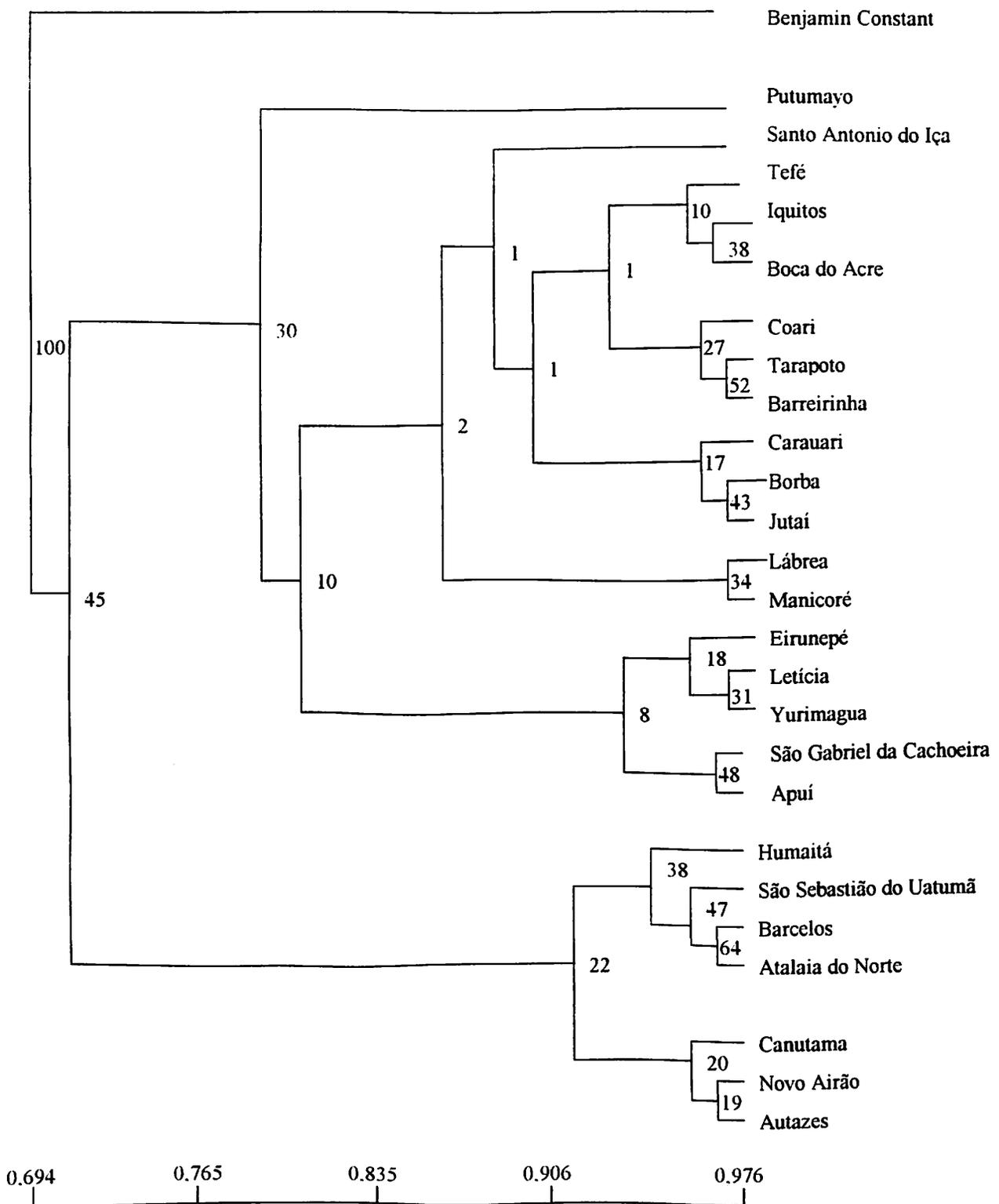


Figura 13. Dendrograma de similaridades de Jaccard (1901) entre as etnovarieties do cubiu (*Solanum sessiliflorum*), obtido pelo método UPGMA, utilizando a análise de bootstrap, com 1000 repetições. Os números representam a consistência dos nós em porcentagem.

No dendrograma das etnovariedades baseado nas distâncias de Nei & Li (1972), observou-se uma estrutura similar ao do dendrograma das similaridades de Jaccard, apresentando três grupos, (Figura 14): o grupo 1, formado por uma única etnovariedade originária de Benjamin Constant (AM), com distância variando de 0,819 a 0,988 e consistência de 100 %, com relação as outras etnovariedades; o grupo 2, reuniu (69,2 % das etnovariedades estudadas) cujo material genético foi procedente da Amazônia Ocidental; e o grupo 3, que pareceu mais consistente, reuniu 26,9 % das etnovariedades do material estudado e, com exceção da inclusão da etnovariedade procedente de Atalaia do Norte, representou muito bem o agrupamento das etnovariedades dentro da Amazônia Central.

De maneira geral, o dendrograma formado pelas etnovariedades de cubiu deixou uma indicação bem clara da forma pela qual esses indivíduos podem ser aproveitados em termos de melhoramento dessa espécie.

Com relação ao surgimento de uma etnovariedade oriunda Amazônia Central (Barreirinha) dentro do grupo da Amazônia Ocidental e vice-versa (Atalaia do Norte), é possível explicar, porque nos 500 anos após a conquista das Américas, os índios, caboclos, e muitos outros indivíduos representantes de outras etnias, têm se deslocado para diferentes locais da Amazônia levando consigo, o cubiu que hoje pode ser encontrado em menor ou maior quantidade, em toda a Amazônia.

Pelos grupamentos que foram formados, pelo menos seis etnovariedades poderão ser selecionadas para aproveitamento como progenitores em programa de melhoramento do cubiu: a procedente de Benjamin Constant (distância de 0,981 e consistência de 100 %); a de Putumayo (distância de 0,947 e consistência de 45 %); a de Carauari (0,965 de distância e consistência de 34 %); a de São Gabriel da Cachoeira (0,974 de distância e 34 % de consistência); a de Humaitá (0,945 de distância e 38 % de consistência) e a de Autazes (0,945 de distância e 17 % de consistência).

Na concepção de Cruz *et al.* (1994), entre as espécies vegetais devem ser evitados cruzamentos entre cultivares do mesmo padrão de similaridade, para maximizar a variabilidade indispensável em qualquer programa de melhoramento. O que se verificou nesta pesquisa, é que muitas etnovariedades que apresentavam formas diferentes de frutos,

se juntaram no mesmo grupo. Portanto, o material divergente, morfologicamente, poderá compor o grupo de indivíduos que podem ser aproveitados como possíveis progenitores, para o melhoramento do cubiu.

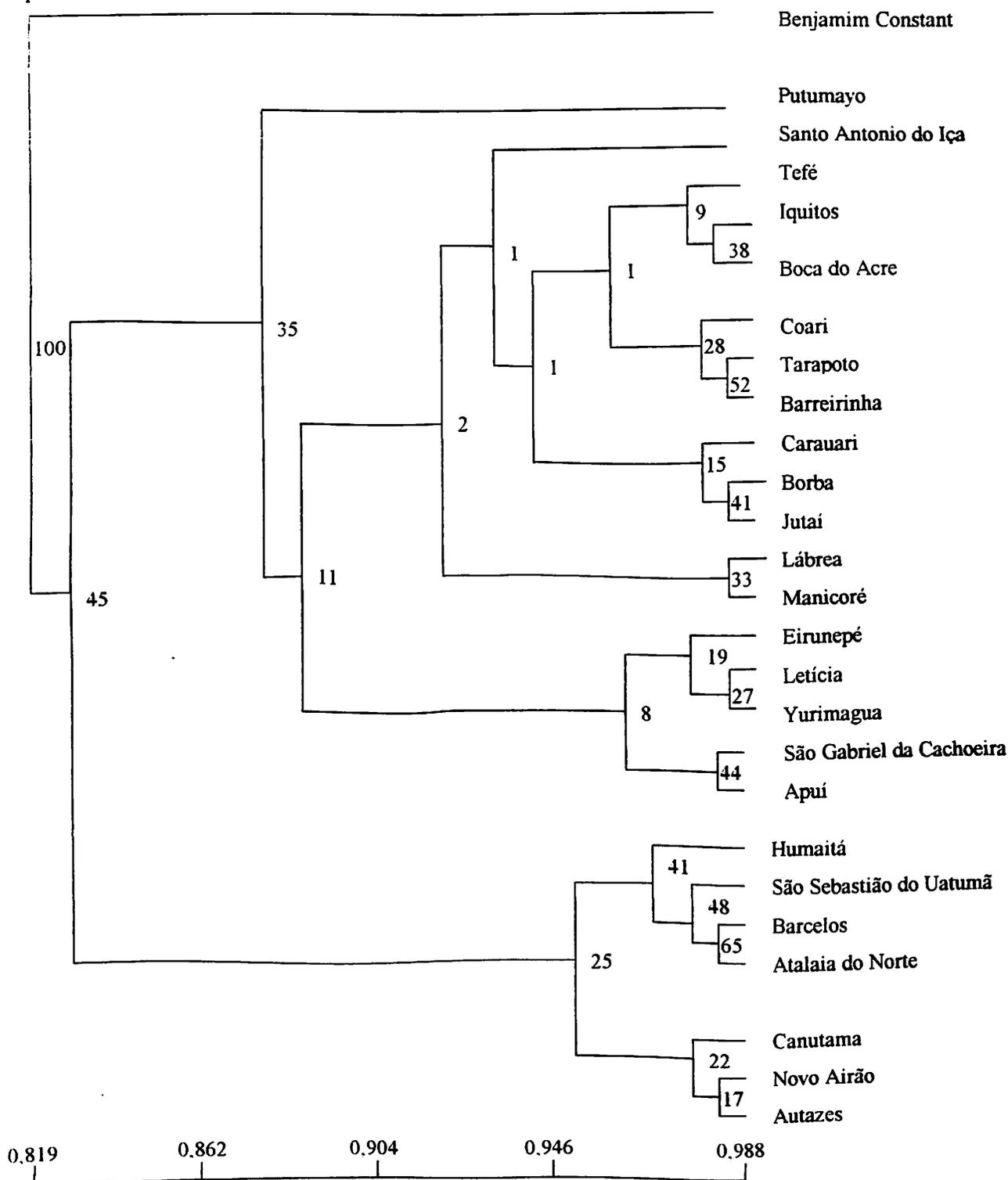


Figura 14. Dendrograma de similaridades de Nei & Li (1972) entre as etnovarietades do cubiu (*Solanum sessiliflorum*), obtido pelo método UPGMA, utilizando a análise de bootstrap, com 1000 repetições. Os números representam a consistência dos nós em percentagem.

## 7. CONCLUSÕES

- Dentre os caracteres morfológicos, qualitativos, que mais discriminaram as 28 ETN's do cubiu estudadas, destacou-se a forma dos frutos. Das nove formas detectadas, as de maior e menor predominância foram, respectivamente, a forma globosa e a forma cilíndrica.

- Os frutos globosos variaram de pequeno (3,2 cm de comprimento por 3,3cm de largura) a grande (9,3 cm de comprimento por 7,6 cm de largura); os pesos médios destes frutos variam de 18,5g e 301g, respectivamente.

- As ETNs que produziram o menor e o maior número de frutos foram as procedentes de Benjamin Constant (4 frutos) e de Leticia (89,3 frutos).

- Uma ampla variação genética das 28 ETNs do cubiu foi detectada por meio da análise da composição elementar dos frutos: o teor de umidade dos frutos variou de 86,7% à 93,5%; de cinzas de 6,2% a 12%; de proteína bruta, de 2,3% a 9,2%; de lipídios, de 1,3 a 27,2% e, de carboidratos de 58,5% a 87,3%.

- A ETN 11, originária de Tarapoto (Amazônia Peruana), apresentou um teor de 9,2% de proteína, cujo valor é superior aos apresentados pelo tomate, pimentão, beringela, e outras hortaliças e frutos mais consumidos mundialmente.

- Com relação aos macro e microelementos contidos nos frutos do cubiu, as ETNs de um modo geral apresentaram altos teores de K, Zn e Fe . A ETN originária de Lábrea (AM), foi a que apresentou maior concentração destes elementos minerais em seus frutos 563,5mg, 623,7µg e 352,7µg, respectivamente.

- Nenhum dos extratos protéicos obtidos a diferentes valores de pH (2,6; 7,6 e 9,0) a partir das farinhas das sementes das ETNs do cubiu, apresentou atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho e humanas do sistema ABO, mesmo quando as mesmas foram tratadas com enzimas proteolíticas.

- Pela magnitude da associação estimada entre pares de caracteres morfológicos EP, NL, PMF, LF, CF, PS, PC e QS permitem seleccionar, simultaneamente, genótipos para o melhoramento do cubiu.

- Por meio da associação entre caracteres morfológicos e químicos, é factível selecionar genótipos importantes para o melhoramento do cubiu. Os caracteres EP e PMF são os que apresentam maiores valores de coeficiente de correlação genotípica entre, pelo menos, seis dos dez elementos minerais determinados nesta pesquisa.

- O caráter NL apresentou maior magnitude de associação com todos os elementos químicos. A menor e a mais elevada correlação formada entre pares com o NL deu-se entre NL e LIP ( $r_G = 0,567^*$ ) e NL e CIN ( $r_G = 0,889^{**}$ ).

- Os meios de associações entre o caráter PRO e os componentes químicos importantes do cubiu, PRO + Fe, PRO + Mg, e, Pro + Ca ( $r_G = 0,786^{**}$ ,  $r_G = 0,754$  e  $r_G = 0,768^{**}$ ), respectivamente, permitem selecionar outros elementos químicos que contribuirão para o melhoramento do cubiu, para alimentação humana.

- Presume-se que caracteres morfológicos e químicos, desejáveis ao melhoramento do cubiu para dieta alimentar humana, possam ser selecionados simultaneamente, sendo o cálcio o elemento que mais se destacou entre todos os que fizeram parte desta pesquisa.

- As concentrações de DNA genômico das ETNs do cubiu extraído com o reagente CTAB, com variações na concentração de Na Cl no tampão e no agente de precipitação, estimadas pela absorbância a 260 nm, foram bastante variáveis, obtendo-se valores entre 73,0  $\mu\text{g/ml}$  a 494,0  $\mu\text{g/ml}$ , apresentando vários fragmentos de aproximadamente 23 kb, sem degradação aparente de RNA.

- Todas as amostras apresentaram graus de pureza satisfatórios, quando mensuradas pela relação  $A_{260}/A_{280}$ . Esses valores, em torno de 1,85 a 2,28 indicaram que o DNA purificado possuía pequena contaminação por proteínas e que, a metodologia é considerada eficiente e adequada, para as análises com material genético do cubiu.

- Todas as reações realizadas com a técnica RAPD apresentaram bandas definidas, de alta fidelidade e repetitividade, sendo que dos sete sete *primers* utilizados, apenas um não foi capaz de detectar polimorfismo no DNA das amostras da espécie. Dos 59 fragmentos de DNA amplificados detectados pelos *primers* utilizados, 28 são polimórficos.

- Os coeficientes de similaridades calculados pelo modelo matemático de Nei & Li variaram de 0,819 entre a ETN 1 e a ETN 16, de 0,988 entre as ETNs 3 e 25, enquanto os coeficientes calculados pelo modelo de Jaccard variaram de 0,694 entre a ETN 1 e a ETN 16, e de 0,976 entre a ETN 3 e a ETN 25.

- O dendrograma das ETNs baseado nas similaridades de Nei & Li e de Jaccard demonstrou estrutura semelhante, nos três grupos destacados : o Grupo I, formado por uma única ETN originária de Benjamin Constant (AM), com distância variando de 0,819 à 0,988 e, consistência de 100%; o Grupo II, representando 69,2% das ETNs estudadas reuniu o material genético procedente da Amazônia Ocidental; e, o Grupo III, aparentemente mais consistente reuniu 26,9% das ETNs pesquisadas e, com exceção da inclusão da ETN 25, procedente de Atalaia do Norte, representou bem o grupamento das ETNs dentro da Amazônia Central.

- Pelos grupamentos que foram formados, pelo menos seis ETNs poderão ser selecionadas para aproveitamento como progenitores em programa de melhoramento genético do cubio: as procedentes de Benjamin Constant, Carauari, São Gabriel da Cachoeira, Humaitá, Autazes (AM) e Putumayo (Peru), com distâncias de 0,981, 0,965, 0,974, 0,945 e 0,945 e consistência de 100%, 34%, 34%, 38%, 17% e 45%, respectivamente.

- A hipótese de que as ETN's de cubiu da Amazônia poderia ser discriminada por suas características qualitativas e quantitativas morfológicas, químicas e dos marcadores moleculares foi confirmada.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achille, A.; Baron, A.; Zamboni, G.; Di pace, C.; Orlandini, S.; Scarpa, 1998. A. Chromosome 5 allelic losses are early events in tumours of the papilla of Vater and occur at sites similar to those of gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 78(12): 1653-1660.
- Akinwale, S. A. 1992. Allopollen exchange in cashew. *Plant Cell*, 24: 7-9.
- Alcazar, J.E. 1981. Genetic resources of tomatoes and wild relatives. Roma: Longman. 121 p.

- Allard, R.W. 1972. The effect of selection on esterase allozymes in a barley population. *Genetics*, 72:489-503.
- Allard, R.W.; Jain, S.K.; Workman, P.L. 1968. The genetics of inbreeding population. *Advance in Genetics*, 14:55-131.
- Allen, A. K.; Desai, N.N. Neuberger, A.; Gresth, J.M. 1978. Properties of potato lectin and nature of its glycoprotein linkages. *Biochemical Journal*, 171:665-674.
- Allen, A.K.; Neuberger, A. (1973). The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxiprolin-containing glycoprotein. *Biochemistry Journal*, 135: 307-314.
- Alves, M.J.M; Colli, W. 1974. Agglutination of *Trypanossoma cruzi* by Concanavalin. *Protozoology*, 21:575-578.
- Anon, Anuário Estatístico do Brasil. IBGE Publication. Rio de Janeiro – RJ. Brazil. 1995.
- AOAC.1995. Association of Official Analytical Chemists/*Official methods of analysis*. 16 ed. Arlington. 1141p.
- Baethgen, W.E.; Alley, M.M. 1989. A manual colorimetric procedure for mensuring ammonium nitrogen in soil and plant kjeldahl digests. *Soil Plant Analysis.*, 20(9/10):961-969.
- Balbach, A.; Boarim, D. 1992. *As hortaliças na medicina natural*. 1 ed. Itaqucetuba, SP : Editora Missionária. 291p.
- Barros, L. M. 1988a. *Aspectos técnicos do plantio e condução do cajueiral*. In: Lima, V. P. M. S. A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil. Fortaleza – CE. BNB/ETENE, p. 159-193.
- Barros, L. M. Biologia floral, Colheita e Rendimentos. 1988b. In: Lima, V. P. M. S. A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil. Fortaleza – CE. BNB/ETENE, p. 159-193.
- Barros, L. M.; Paiva, J. R.; Cavalcanti, J. J. V. 1998. *Revista Brasileira de Biotecnologia* 1, 25(1):45-53.

- Barros, L. M.; Pimentel, C. R. M.; Corrêa, M. P. F.; Mesquita, A. L. M. 1993. *Recomendações Técnicas para a Cultura do Cajueiro Anão Precoce*. Fortaleza: EMBRAPA – CNPAT, 65p.
- Barroso, G.M.; Amorim, M.P.; Peixoto, A. L.; Ichaso, C.L.F. 1999. *Frutos e sementes. Morfologia aplicada à Sistemática de Dicotiledôneas*. Ed. UFV, Universidade Federal de Viçosas. 443p.
- Bosseau, C.; Causse, H.; Moisand, A.; Pere, D.; Cavada, B.S.; Rougé, P. 1984. *Localization and biosynthesis of Lathyrus ochurus seed lectin*. In: Arnaud, P.; Bienvenu, J.; Laurent, P. eds.: *Marker Proteins in inflammation*. 2:651-654.
- Bowers, K.A.W. 1975. The pollination ecology of *Solanum rostratum* (Solanaceae). *Amer. Jour. Bot.*, 62(6):633-638.
- Bowles, D.J.; Kaus, H. 1976. Characterization enzymatic and lectin properties of isolated membranes from *Phaseolus aureus*. *Biochem. Biophys.*, 72:248-254.
- Boyd, W.C.; Shapleigh, E. 1954. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brauer, O. 1976. *Fitogenética aplicada*. México. Editorial Limusa, 518 p.
- Brücher, H. 1968. Plant genetics and development in tropical zones. *Applied Sciences and Development*. 2:85-95.
- Buchmann, S.L.; Jones, C.E.; Colin, L. J. 1977. Vibratile pollination of *Solanum douglassi* and *S. xanti* (Solanaceae) in Southern California. *The Wasmann Jour. Biol.*, 35(1):1-25.
- Caetano-Anolles, G.; Bassam, B. J.; Gresshoff, P. M. 1991. High resolution DNA amplification fingerprint using very short arbitrary oligonucleotide primers. *biotechnology.*, 9:553-557.

- Casotto, M.; Pallozo, A. L.; Agostini, G.; Benshimol, A. L. 1984. Estudo de las lectinas presentes em semillas de *Papilionoideae* (Leguminosae) de Venezuela. *Acta Cientifica Venezuelana*. 35:248-252.
- Cavada, B.S. 1980. Lectinas de *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolamento, caracterização parcial e comportamento durante a germinação. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Ceará. 87 p.
- Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A.; Grangeiro, T.B. 1993. Primary structures and functions of plant lectins. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 5(2): 193-202.
- Cavada, B.S.; Ramos, M.V.; Cordeiro, E.F.; Grangeiro, T.B.; Oliveira, J.T.A.; A. de F.F.U. Carvalho, A.; Moreira, R.A. 1996. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* . 8(1): 37-42.
- Chan Júnior, H.T.; Kuok, S.C.M. 1976. Identification of sugars in some tropical fruit products. *Journal of Food Science*, 40(2):419-430.
- Clement, C.R. 1989. A center of crop genetic diversity in Western Amazonia. *Bioscience*, 39:624-631.
- Coelho, P. J. A.; LOPES, C. R. 1995. Caracterização da variabilidade genética de 4 populações naturais de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) com isoenzimas. *Revista Brasileira de Genética*. 18(3), Supl.:267.
- Cole, H.B; Ezzell, J.W.; Keller, K.F.; Doyle, R.J. 1984. Deferentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by lectins. *J. Clinical Microbiol.* 19(1):48-53.
- Cornelis, R. 1992. Use of references materials trace element analyse of foodstuffs. *Food Chem.*, 43:307-313.
- Delves, H.T. 1992. Sample preparation handling. *Food Chem.*, 43:327-281.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York. Botanical Garden. USA, 1262 p.

- Crowley, J.F. & Goldstein, I.J. (1981). Datura stramonium lectin – Isolation and characterization of the homogeneous lectin. *Febs Letters*, 130: (1) 149-152.
- Cruz, C.D.; Carvalho, S.P.; Vencovsky, R. 1994. Estudos sobre a divergência genética II. Eficiência da predição do comportamento de híbridos com base na divergência de progenitores. *Revista Ceres*, 41:183-194.
- Cruz, C.D. 1990. *Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas*. Piracicaba: ESALQ, 188 p. Tese de Doutorado.
- D'arcy, W.G. 1973. Flora of Panama. Fam. 170 Solanaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 60(3):573-580.
- Deng, Z.N.; Gentile, A.; Nicolis, E.; Domina, F.; Vardi, A.; Tribulato, E. 1995. Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers. *Journal of Horticultural Sciences*, 70:117-125p.
- Desai, P.R.; Springer, G.F. 1972. Eal serum anti-humano blood group H (O) protein. *Meth. Enzymol.*, 28:383-388.
- Dobley, J. 1990. Molecular evidence & the evolution of mize. In: New perspectives on the origin and evolution of New Worl domesticated plants (Bretting, P.K., ed.) *Economic Botany*, 44(3) Supplement: 6-27.
- Duarte, J. M.; Santos, J. B. and Melo L. C. 199. Comparison os similarity coefficients based on RAPD markers in the commom bean. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3) p. 419-427.
- EMBRAPA. 1982. *Boletim agrometeorológico*. Manaus. EMBRAPA/UEPAE, 22 p.
- Emerson, R. A.; Beadle, G. W.; Fraser, A. C. 1935. A summary of linkage studies in maize. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir 180 p.
- Falconer, D.S. 1981. *Introduction to quantitative genetics*. 2 ed. London: Longman, 340 p.
- Federici, C.T.; Farf, D.Q.; Scora, R.W.; Roose, M.L. 1988. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analisys. *Theoretical and Applied Genetics*, 96:812-822.

- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. 1995. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares RAPD e RFLP em Análise Genética*. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 220p.
- Ferri, M.G.; Menezes, N.L.; Monteiro, W.R. 1981. *Glossário ilustrado de Botânica*. São Paulo: Nobel. 197p.
- Fisher, R.A.; Yates, F. 1968. Statistical tables for biological agricultural and medical research. 6 ed., New York: Hafner Publishine, 163p
- Forsch, M. A.; Moreira, R.A.; Ainouz, I.L.; De Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. (1991a). Plant Lectins, Chemical and Biological Aspects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.*, 86: 211-218.
- Frankel, O.H. 1989. Principals and strategies of evaluation. In. Brown, A.H.D., Frankel, O.H., Marshall, D.R., Williams, J.T. *The use of plant genetic resources*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 245-260.
- Freeman, H.J. 1983. Lectin histochemistry of 1,2-dimethylhydrazine- induced rat colon neoplasia. *J. Histochem. Cytochem.*, 31:1241-1245.
- Gartner, T.K.; Ogilvie, M.L. 1984. Isolation and characterization of three Ca<sup>++</sup> dependent beta-galactoside-specific lectins from snake venoms. *Biochem. J.*, 224:301-307.
- Grattapaglia, D.; Sederoff, R. R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*, using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137:1121-1137.
- Grubhoffer, L.; Matha, V. 1991. Characteristics of a new L-Fucose and N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from integument of *Galleria mallonella* larval. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100(1):73-76.
- HARLAN, J. R.; WET, J. M. J. On the quality of evidence for origin and dispersal of cultivated plants. *Curr. Antropol.*, 14(1/2):51-55. 1973.
- Harris, J.A.; Kucks, O.M. 1902. Observations of the pollination of *Solanum rostratum* Dunal and *Cassia chamaecrista* L. Univ. of Kansas Bull., 1:15-43.

- Hegnauer, R. 1986. Phytochemistry and plant taxonomy – an essay on the chemotaxonomy of higher plants. *Phytochemistry*, 25(7):1519-1535.
- Heinze, H. 1983. Some field observations on *Pouteria caimito*, *P. campechiana*, *Diospyros digyna* and *Solanum tojiro* under humid conditions. In: Proceedings of the American Society for Horticultural Science, *Tropical Region*, 27:111-116.
- Heiser, C.B. 1972. The relationships of the naranjilla, *Solanum quitoense*. *Biotropica*, 4: 77-84.
- Heywood, V.H. 1978. Flowering plants of the world. University Press. Oxford, 335 p.
- Hickey, L. J. 1973. Classification of the architecture of Dicotyledoneous leaves. Division of paleobotany, Smithsonian, Washington, DC. *American Journal of Botany*, 60(1):17-33.
- IAL – Instituto Adolfo Lutz. 1985. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Análise de água e alimento. 3 ed. São Paulo. v. 1. 533p.
- Instituto Nacional de Nutrición. 1977. *Composición de los alimentos peruanos*. Instituto Nacional de Nutrición. Lima: Ministerio de Salud, Lima. 329 p.
- Jaccard, P. 1901. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull Soc. Vaudoise Sci. Nat.*, 37:547-579.
- Jimenez, J.B. 1982. Apuntes sobre el cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en la zona centro-oriental del Ecuador. In: Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. Quito: INIAP. p. 15-25.
- Johnson, D. 1974. Cashew cultivation in Brazil. *Agron. Mocamb.*, 7(3):119-129.
- Jordan, C.F. 1985. Soils of the Amazon rainforest. In: Prance, G.T.; Lovejoy, C.T. ed. Amazonia. Oxford - New York - Toronto - Sydney - Frankfurt. Pergamon Press. p. 83-94.
- Juan, C.; Iniesta, P.; Veja, F. J.; Peinado, M. A.; Fernandez, C.; Caldes, T.; Massa, M. J.; Lopez, J. A.; Sanchez, A.; Torres, A. J.; Balibrea, J. L.; Benito, M. 1998. Prognostic value genomic damage in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 77(11):1971-1977.

- Kabatt, E. A.; Mayer, M.N. 1967. *Experimental immunochemistry*. Berlin: Springfield. 2. ed. 150 p.
- Kawakami, K.; Yasuda, J.; Shiraishi, M.; Kayama, T.; DOI, K.; Perucho, M.; Sekiya, T. 1998. Detection of DNA abnormalities by arbitrarily primed PCR fingerprint: allelic losses in chromosome 10q in lung cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251(1):153-157.
- Kerr, W.E.; Clement, C.R. 1980. Práticas agrícolas com conseqüências genéticas que possibilitaram aos índios da Amazônia uma melhor adaptação às condições regionais. *Acta Amazonica*, 10(2):251-261.
- Khandra, D. K.; Tuna, M.; Tal, M.; Nejdat, A.; Golan-Goldhirsh, A. 1997. Variability in the pattern of Random Amplified Polymorphic DNA. *Electrophoresis*, 18(15): 2852-2856.
- Khatounian, C.A. 1997. A sustentabilidade e o cultivo de hortaliças. *Horticultura Brasileira*, 15: 199-204.
- Laemmli, U.K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lambrechts, E.; Van Driessche, E., Kanarek, L. 1984. The purification of tomato lectin (*Lycopersicon-esculentum* L). *Archives Internationales de Physiologie de Biochimie et de Biophysique*, 92(1):39-40.
- Lawrence, G.H.M. 1970. *Taxonomy of vascular plants*. New York: The Macmillan. 823p.
- Leite, L. A. DEL S. A. 1994. *A Agroindústria do Caju no Brasil: políticas públicas e transformações econômicas*. Fortaleza EMBRAPA – CNPAT, 195p.
- Lethi, K.K. 1989. The iron, folic acid and zinc status of low socio-economic pregnant and lactating amazonian women. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 43:503-513.
- Liener, I.E.; Sharon, N.; Goldstein, I.J. 1986. *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. New York: Academic Press. 600 p.
- Linsley, E.G.; Cazier, M.A. 1963. Further observation on bees which take pollen from plants of the genus *Solanum*. *Pan-Pacific Entomol.*, 39(1):1-18.

- Lord, J.M. 1987. The use of cytotoxic plant lectins in cancer therapy. *Plant Physiol.*, 85: 1-3.
- Matos, F.J. A. Alencar, J.W.; Craveiro, A.A.; Machado, M.I.L. 1992. Ácidos graxos de algumas oleagenosas tropicais em ocorrência no nordeste do Brasil. *Química Nova*, 15(3):181-185.
- Matos, F.J.A. 1988. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: UFC, 128 p.
- Maxr, F.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G. 1998. Chemical composition of the fruit of *Solanum sessiliflorum*. *Z Lebensm Unters Forsch A.*, 206:364-366.
- Mettler, L. E.; Gregg, T. G. 1973. *Genética de Populações e Evolução*. São Paulo: Polígono/EDUSP. 262p.
- Mitchell, J. D.; Mori, S. A. 1987. The cashew and its relatives (*Anacardium: Anacardiaceae*). *Mem. New York Bot. Gar.*, 42:1-76.
- Mnoney, E. E.; Mantell, S. H.; Tsoktouridis, G.; Amin, S.; Bessa, A. M. S.; Thangavelu, M. 1997. RAPD-profiling of Tanzanian cashew. In: International cashew na coconut conference. Abstracts of papers and posters. p 23.
- Moreira, R.A.; Cavada, B.S.; De Oliveira, J.T.A.; Ainouz, I.L. 1991. Plant Lectins. In: Oliveira, B. and Sgarbieri, V. Eds.: *Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins*. CONBRAP – Unicamp. p. 71-96.
- Moreira, R.A.; Cordeiro, E.F.; Cavada, B.S.; Nunes, E.P.; Fernandes, A.G.; Oliveira, J.T.A. 1993. Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 5(2): 127-132.
- Moreira, R.A.; Cordeiro, E.F.; Cavada, B.S.; Nunes, E.P.; Fernandes, A.G.; Oliveira, J.T.A. 1995. Lectins and the chemotaxonomy of the sub-tribe *Diocleinae* (*Leguminosae-Phaseoleae*). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 7(1): 7-14.
- Moreira, R.A.; Perrone, J.C. 1977. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, 59:783-787.
- Morton, J. F. 1961. The cashew's brighter future. *Econ. Bot.*, 15(1): 57-58.

- Mota, M. 1956. O *cajueiro nordestino*. Serviço da Documentação do Ministério da Educação e Cultura. Rio de Janeiro. 125p
- Mowlah, G.; Itoo, S. 1982. Guava (*Psidium guajava* L.) sugar componente and related enzymes at stages fruit development and ripening. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology*, 29(8): 472-476.
- Mullis, K.; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55:335-350.
- National Research Council. 1989. Recommended Dietary Allowances. 10 ed. Material Academy Press. 283 p.
- Nei, M.; Li, W. H. 1972. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:5269-5273.
- Noda, H.; Paiva, W. O.; Silva Filho, D.F.; Machado, F.M. 1997. Melhoramento de hortaliças convencionais para o cultivo no Trópico Úmido. In: Duas décadas de contribuições do INPA à pesquisa no Trópico Úmido/Hiroshi Noda, Luiz Augusto de Souza e Ozório José de Menezes Fonseca. Manaus: INPA. p.59-88.
- Ochiai, A. 1957. Zoogeographic studies on the solcoid fishes found in Japan and its neighbouring regions. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 22: 526-530.
- Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S.; Martins, J.L.; Jarenkow, J.A., Vasconcelos; I.M.; Moreira, R.A. 1990. Lectinas presentes em sementes da tribo *Dioclea* como marcadores taxonômicos. *Acta Botanica Brasilica*, 4(2):159-163.
- Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S.; Moreira, R A. 1989. Isolation and partial characterization of lectin from *Cratylia floribunda* seeds. *Ver. Bras. Bot.*, 14:61-66.
- Overland, L. 1960. Endogenous rhythm in opening and odor of flowers of *Cestrum nocturnum*. *Amer. Jour. Bot.*, 47:378-382.
- Pahlen, A.V.D. 1977. Cubiu (*Solanum topiro* Humbl. & Bonpl.), uma fruteira da Amazônia. *Acta Amazonica*, 7:301-107.

- Patiño, V.M. 1963. Plantas cultivadas y animales domesticos en America Equinoccial. 1 ed. Imprenta Departamental: Cali, Colombia. p. 408-411.
- Paula Pessoa, P. F.; Leite, L. A. S.; Pimentel, C. R. M. *Situação Atual e Perspectivas da Agroindústria do Caju* 1995. In: Araújo, J. P. P.; Silva, V. V. Cajulcultura: Modernas Técnicas de Produção. Fortaleza: EMBRAPA – CNPAT, p.23-42.
- Payne, W.W. 1978. A glossary of plant hair terminology. *Britonia*, 30(2):239-255.
- Paytan, S.F. 1997. *Cultivo de frutales nativos amazónicos: Manual para o el extensionista*. Lima: Tratado de Cooperación Amazónica, p. 71-76.
- Peumans, W.J.; Allen, A.K.; Cammue, B.P.A. 1986. A new lectin from meadow saffron (*Colchicum automale*). *Plant Physiol.*, 82:1036-1039.
- Pitombo, R. N. M. 1989. A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. *Ciência e Cultura*, 41(5): 427-431.
- Plomion, C.; O'Malley, D. M.; Durel, D. E. 1995. Genomic Analysis in maritime pinus (*Pinus pinaster*). Comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual. *Theor. Appl. Genet.*, 90:1028-1034.
- Poehlman, J.M. 1979. Genetics and plant breeding: gene recombination. In: Poehlman, J.M. *Breeding field crops*. 2 ed. Westport: Avi Publishing. Cap. 3, p. 29-54.
- RADAMBRASIL. 1977. *Levantamento dos recursos naturais*. Rio de Janeiro: Graphos Industrial Gráfica Lada, v. 15, 431 p.
- Radford, A.E. 1986. *Fundamentals of plant systematics*. Harper & Row, Publishers, Inc. 498p.
- Rafalski, J. A.; Tingey, S. V.; Williams, J. G. K. 1991. RAPD markers – a new technologies for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News and Information*, 3: 645-648.
- Rafferty, M. E.; Baltch, A. L.; Smith, R. P.; Bopp, L. H.; Rheal, C.; Tenover, F. C.; Killgore, G. E.; Lyerly, D. M.; Wilkins, T. D.; Schoonmaker, D. J.; Hannet, G. E.; Shayegani, M. 1998. Comparison os restriction enzymes analysis arbitrarily primed PCR,

- and proteine profile analysis turing for epidemiologic inveestigation of na ongoing *Clostridium difficile* outbreak. *J. Clin. Microbio*, 36(10):2957-2963.
- Raikhel, N.V.; Liener, D.R. 1991. Expression and regulation of lectin genes in cereals and rice. *Develop. Genet*, 12:255-260.
- Reinold, L.; Liwscheitz, Y. 1986. *Progress in phytochemistry*. Vol. 1, New York: Academic Press, 687 p.
- Ribeiro, M.N.G. 1976. Aspectos climatológicos de Manaus. *Acta Amazonica*, 6(2):229-233.
- Rougé, P.; Richardson. M.; Yarwood, A.; Cavada, B.S. 1987. Single and two-chain legume lectins as phylogenetic marker of speciation. *Biochem. Syst. Ecol.*, 15: 341-348.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoeffel, S.; Shcarf, S. J.; Niguchi, G.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polimerase. *Science*, 239:487-491.
- Saiki, R. K.; Shcarf, S. J.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. 1985. Enzimatic Amplification of the beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354.
- Salati, E. 1985. *The climatology and hidrology of Amazonia*. In: Prance, G.T.; Lovejoy, C.T. ed. Amazonia. Oxford - New York - Toronto - Sydney - Frankfurt: Pergamon Press, p. 18-48.
- Salick, J. 1987. Cocona (*Solanum sessiliflorum*) production and breeding potentials of the peach-tomato. In: Wickens, N.H; Day, P. New crops for food and industry. Ed. Chapman and Hall. p. 258-264.
- Salick, J. 1989. Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal, an. Overview of productions and breeding potentials. In: International Symposium on new crops for food and industry. Southampton: University Southampton, p. 125-129.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 120p.

- Sánchez, P.A.; Bandy, D.E.; Villachica, J.H.; Nicolaidis, J.J. 1982. Amazon basin soils: Management for continuous crop production. *Science*, 216:821-827.
- Sander, A.; Ruess, M.; Bereswill, S.; Schuppler, M.; Steinbrückner, B. 1998. Comparison of different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 36(10):2973-2981.
- Schaefer, R.L.; Keller, K.F.; Doyle, R.J. 1979. Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutination for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.*, 10:669-672.
- Schilling, Jr.; Heiser, C.B.; Blanc, A.A. 1979. Crossing relationship among diploid species of the *Solanum nigrum* complex in North America. *Amer. Jour. Bot.*, 66(6):709-716.
- Schultes, R.E. 1984. Amazonian cultigens and their northward migrations in pre-Colombian times. In: *Pre-historic plant migration*. Cambridge: Harvard University Press. p. 19-38.
- Schultes, R.E.; Romero Castañeda, R. 1962. Edible fruits of *Solanum* in Colombia. *Bot. Museum Leaflets*. Harvard University. Camb. Mass., 19(10):235-286.
- Sendtner, O. 1846. *Flora Brasiliensis*. V. 6. 522 p.
- Sharon, N.; Liss, H. 1989. *Lectins*. London: Chapman and Hall. 126 p.
- Shrimpton, R.; Giugliano, R. 1979. Consumo de alimentos e alguns nutrientes em Manaus. *Acta amazonica*, 9(1):17-41.
- Silva Filho, D.F. 1994. Variabilidade genética em 29 populações de cubiu (*Solanum tojiro* Humbl. & Bonpl. Solanaceae) avaliada na Zona da Mata do estado de Pernambuco. UFRPE: Recife, PE. Dissertação de Mestrado. 80 p.
- Silva Filho, D.F. 1998. *Cocona (Solanum sessiliflorum Dunal): cultivo e utilização*. Caracas, Venezuela: Secretaria Pro-Tempore. Tratado de Cooperación Amazonica. 114 p.
- Silva Filho, D.F.; Andrade, J.S.; Clement, C.R.; Machado, F.M.; Noda, H. 1999. Correlações fenotípicas, genéticas e ambientais entre descritores morfológicos e químicos em frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. *Acta Amazonica*, 29(4):503-511.

- Silva Filho, D.F.; Anunciação Filho, C.J.; Noda, H. 1998. Estimativas de herdabilidades e correlações entre caracteres em populações de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 20(1):60-67.
- Silva Filho, D.F.; Anunciação Filho, C.J.; Noda, H.; Reis, O.V. 1996. Variabilidade genética em populações naturais de cubiu da Amazônia. *Horticultura Brasileira*. 14(1):9-15.
- Silva Filho, D.F.; Anunciação Filho, C.J.; Noda, H.; Reis, O.V. 1997. Seleção de caracteres correlacionados em cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) empregando a análise de trilha. *Acta Amazonica*, 27(4):229-240.
- Silva Filho, D.F.; Anunciação Filho, C.J.; Noda, H.; Reis, O.V. 1995. Análise multivariada da divergência genética em 29 populações de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) avaliada na Zona da Mata do Estado de Pernambuco. *Acta Amazonica*. 25:171-180.
- Silva Filho, D.F.; Clement, C.R.; Noda, H. 1989. Variação fenotípica em frutos de doze introduções de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) avaliadas em Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*. 19:9-18.
- Silva Filho, D.F.; Clement, C.R.; Noda, H. 1990. Relação entre descritores dos frutos e populações de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) avaliadas na Amazônia Central. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 10(2): 67-70.
- Silva Filho, D.F.; Machado, F.M. 1997. Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). In: Hortaliças não-convencionais da Amazônia / Marinice Oliveira Cardoso, Coordenadora. – Brasília: Embrapa-SPI; Manaus: Embrapa-CPAA. p. 97-104.
- Silva Filho, D.F.; Noda, H.; Clement, C.R. 1993. Genetic variability of economic characters in 30 accessions of cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) evaluated in Central Amazonia. *Revista Brasileira de Genética*. 16(2):409-417.
- Silva Filho, D.F.; Noda, H.; Paiva, W.O.; Machado, F.M. 1997. Hortaliças não convencionais e introduzidas na Amazônia. In: Duas décadas de contribuição do INPA à pesquisa agrônoma no Trópico Úmido / Hiroshi Noda, Luiz Augusto Gomes de Souza, Ozório José de Menezes Fonseca. – Manaus: INPA. p. 19-58.

- Silva Neto, S. P. ; Maruta, I.; Takaiwa, F.; Matsumoto, K. 1993. Identification of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Seedlings with RAPD Markers. International Symposium on Tropical Fruits, Program and Abstract. Vitória – ES; EMCAPA. P. 2-3.
- Simone, M.D.; Russo, M.P.; Puleo, G.; Marsan, P. A.; Lorenzoni, C.; Marocco, A.; Recupero, G.R. 1990. Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. *Fruits*, 53:383-390.
- Singh, K. P.; Roy, D. 1999. Detection mutation(s) or polymorphic loci in the genome of experimental animal and human cancer tissues by RAPD/AP-PCR depend on DNA polymerase. *Int. J. Oncol.*, 14(4):753-758.
- Sokal, R. R.; Sneath, P. H. A. 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman. P.128.
- Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. 1960. *Principles and procedures of statistics*, New York: McGraw-Hill. 481 p.
- Stern, W.T. 1992. *Botanical Latin. History, Grammar, Syntax, Terminology and Vocabulary*. Ed. Hafner Publ. Comp. New York. 223p.
- Storti, E.F. 1988. Biologia floral de *Solanum sessiliflorum* Dunal, var. *sessiliflorum*, na região de Manaus. *Acta Amazonica*, 18:56-68.
- Stuber, C.W. 1992. Biochemical and molecular markers in plant breeding. In: Dudley, J.W., Hallauer, A.R., Ryder, M. (Ed.). *Plant breeding reviews*. John Wiley, New York, 50-62.
- Sturtevant, A. H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila* as shown by their mode of association. *Journal Exp. Zoology*. 14:43-59.
- Symon, D.E. 1979. Sex forms in *Solanum* (Solanaceae) and the role of pollen collecting insects. In: The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Hawkes, J.G.; Lester, R.N.; Skelding, A.D. Academic Press, London. P 380-400.
- Teixeira, G.H.A.; Durigan, J.F.; Alves, R.E.; Filgueiras, H.A.C.; Moura, E.F.H. 2001. Frutos do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart): Caracterização, qualidade e conservação. I. Análises químicas e bioquímicas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(1):116-120.

- Tingey, S. V.; Deltufo, J. P. 1992. Genetics analysis with Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Plant Phys*, 101:349-352.
- Todd, J.E. 1882. On the flowers of *Solanum rostratum* and *Cassia chamaecrista*, *Amer. Jour. Nat.*, 16:281-287.
- Triebold, H. O. 1946. *Quantitative analysis with applications to agricultural and food products*. New York: D. Van Nostyrand Co., 331 p.
- Tucker, G. A. 1993. *Introduction*. In: Seymour, G.B.; Taylor, J.E.; Tucker, G. A. *Biochemistry of fruit ripening*. Cambridge: Chapman & Hall, p. 3-43.
- Umetsu, K.; Yamashita, K.; Suzuki, T. 1991. Purification and carbohydrates binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charybdis japonica*). *J. Biochem.*, 109(5):718-721.
- Van Damme, E.J.M. Goldsrein, I.J.; Peumans, W.J. 1991. A comparative study of mannose-binding lectins from the Amaryllidaceae and Alliaceae. *Phytochemistry*, 30 (2):509-514.
- Van Damme, E.J.M.; Allen, A.K.; Peumans, W.J. 1988. Related mannose-specific lectins from different species of the family Amaryllidaceae. *Physiol. Plantarum*, 73:52-57.
- Van Guren, J.P. 1979. The chemistry of texture in fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies*, v.10, p.1-23.
- Veeraraghavan, P. G.; George, A. 1981. A study on the performance of the seedlings progenies in cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Ind. Cashew J.*, 14(1):5-6.
- Veltry, R. W.; Miller, M. C.; Zhao, G.; Marley, G. M.; Wright, G. L. JR.; Vessela, R. L.; Ralph, D. 1999. Interleukin-8 serum levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology*, 53(1):531-536.
- Veres, J.; Grubhoffer, L. 1991. Detection and partial characterization of a new plasma lectin in the hemolymph of the tick *Ornithodoros tartakovsky*. *Microbios Lett.*, 45(178):61-64.
- Vieira, L.S. 1975. *Manual da Ciência do Solo*. São Paulo: Agronômica Ceres. 464 p.

- Villachica, H. 1995. *El cultivo del camu camu* (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) *en la Amazonia* Peruana. Lima, Peru: Secretaria Pro-Tempore, Tratado de Cooperación Amazonica. 95 p.
- Villachica, H. 1996. Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal). In: Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Por Hugo Villachica. Lima: Secretaria Pro-Tempore. P. 98-102.
- Vinyals, A.; Alia, P.; Llorens, A.; Adrover, M.; Gonzáles-Garrigues, M.; Masramon, L.; P, M. A.; Fabra, A. 1998. Detection of differentially expressed gelatinase A in metastatic and non-metastatic subpopulations of tumor cells by target RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction (TRAP - PCR). *Clin. Exp. Metastasis*, 16(7):603-611.
- Wahlen, M.D.; Costich, D.E.; Heiser, C.B. 1981. *Taxonomy of section Lasiocarpa*. *Gentes Herbarum*, 12(2):41-129.
- Watanabe, M.; Muramatsu, T.; Shirame, H.; Ugai, K. 1982. Discrete distribution of binding sites for *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and for peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 29:779-790.
- Weberling, F. 1989. *Morphology of flowers and inflorescences*. Dep. Of Biology, University of Ulm. Cambridge University Press.: 318p.
- Welsh, J.; McClelland, M. 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18:7213-7218.
- Williams, J. G. K.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. 1993. Genetics analysis using RAPD markers. *Methods Enzymol.*, 218:704-740.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. G.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful RAPD markers. *Nucleic Acid Res.*, 18:6531-6535.
- Wright, S. 1978. *Variability within and among natural populations*. Chicago: University of Chicago. V. 2, 250 p.

- Wueberling, F.; Schwates, H.O. 1926. *Taxonomia vegetal*. Tradução da 4ª Ed. Alemã *Pflanzensystematik* por Werner S. Rothschild, revisão e notas de Antonio Lamberti. Editora Pedagógica e Universitária. 314p.
- Yamada, Y.; Aketa, K. 1982. Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 709:220-226.
- Yaselga, T.M.; Larrena, L.; Rios-Castaño, D. 1977. Caracterización de 3 tipos de guajaba en 6 zonas de producción del Ecuador com fines industriales. *Horticultural Science*. 21: 18-20.
- Yuyama, L.K. O.; Cozzolino, S.M.F.; Rocha, Y.R. 1992. Composição química e percentual de adequação de dieta regional de Manaus, AM. *Acta Amazonica*, 22(4):587-93.
- Yuyama, L.K.O.; Aguiar, J.P.; Macedo, S.H.M.; Gioia, T.; Silva Filho, D.F.1997. Composição centesimal de diversas populações de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Estação Experimental do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA. In: Anais do II Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Campinas, S. P., Brasil.
- Yuyama, L.K.O.; Macedo, S.H.M.; Yomkura, L.; Aguiar, J.P.; Silva Filho, D.F.; Yuyama, K. 1998. Teores de minerais em algumas populações de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal): dados preliminares. In: Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Zauluzec, E.J.; Ekabo, O.; Yung, M.; Pavkovic, S.F.; Olsen, K.W. 1990. Binding and structural studies on peanut agglutinins. In: *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* / Bog-Hansen, T.C. Berlin/New York: Walter de Gruyter, p 551-631.
- Zieske, J.D.; Bernstein, I.A. 1982. Modification of cell surface glycoprotein: addition of fucosyl epidermal differentiation. *J. Cell. Biol.*, 95:626-631.
- Zscheile, F.P.; Porter, J.W. 1947. Analytical methods for carotenes of *Lycopersicon* species and strains. *Analytical Chemistry*, 19(1):47-51.