

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SHEILA SUSY SILVEIRA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana* (Poir.)
Govaerts): CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO* E ASPECTOS MORFO-
HISTOLÓGICOS**

CURITIBA

2018

SHEILA SUSY SILVEIRA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana* (Poir.)
Govaerts): CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO* E ASPECTOS MORFO-
HISTOLÓGICOS**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em Ciências ao
Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área
de Concentração em Produção Vegetal,
Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo,
Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal
do Paraná

Orientadora: Profa. Dra. Marguerite Quoirin
Co-orientadores: Juliana Degenhardt
Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos

CURITIBA

2018

Catálogo na publicação
Sistemas de Bibliotecas UFPR
Biblioteca de Ciências Agrárias
Douglas Alex Jankoski CRB 9/1167

S587 Silveira, Sheila Susy
Embriogênese somática em jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.)
Govaerts): condições de cultivo *in vitro* e aspectos morfo-histológicos
/ Sheila Susy Silveira. Curitiba: 2018.
144 f.: il., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia -
Produção Vegetal.

1. Jabuticabeira - Cultivo. 2. Embriogênese somática.
3. Cultivo in vitro. I. Quoirin, Marguerite Germaine Ghislaine.
II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal.
III. Título.

CDU 582.776.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **SHEILA SUSY SILVEIRA** intitulada: **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM JABOTICABEIRA (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts): CONDIÇÕES DE CULTIVO *in vitro* E ASPECTOS MORFO-HISTOLÓGICOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 16 de Fevereiro de 2018.

MARGUERITE GERMAINE GHISLAINE QUOIRIN
Presidente da Banca Examinadora

LUCIANA LOPES FORTES RIBAS
Avaliador Externo

ROSETE PESCADOR
Avaliador Externo

LUIZ ANTONIO BIASI
Avaliador Interno

HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora Marguerite Quoirin, pelo acompanhamento, sugestões e correções. Aos co-orientadores, Juliana e Bruno, pelas ideias de experimentos e auxílio na análise das lâminas, respectivamente. À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de cursar o Doutorado. Agradeço também à CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, pelo incentivo de continuar estudando sempre. Por todo o auxílio e suporte em cada momento de dificuldade.

Aos meus colegas de laboratório durante esses anos de jornada, Fran, Jean, Julio. A todos os estagiários e colegas que, de uma forma ou de outra, colaboraram com a conclusão deste trabalho. Em especial à Fabricia, que muitas vezes foi mais do que uma amiga, abrindo mão de seu tempo para me ajudar e ensinar.

À Cassiana, pelas conversas. Pela busca de novos objetivos de vida. E por fazer parte do quarto 253.

Ao Zé, por ouvir meu choro e me apoiar sempre.

Mais importante, agradeço ao Rodrigo, grande amigo e conselheiro. Por me ensinar quase tudo que sei de laboratório. Pelo auxílio manual, intelectual e (principalmente) psicológico. Pode ter certeza que eu não conseguiria sem você!

*Nobody said it was easy
It's such a shame for us to part
Nobody said it was easy
No one ever said it would be this hard
Oh, take me back to the start*

- Coldplay

RESUMO

Plinia peruviana é uma espécie de Myrtaceae nativa do Brasil, importante economicamente devido ao sabor e às propriedades medicinais de seus frutos. Dentre as formas de micropropagação, a embriogênese somática pode ser usada para obtenção de grande número de plantas em curto intervalo de tempo. Foram utilizados dois tipos de explantes com o objetivo de estabelecer um protocolo de embriogênese somática dessa espécie. Plantas foram germinadas *in vitro* em meio WPM ou WPM/2, na presença ou ausência de 30 g.L⁻¹ de sacarose, e os discos foliares foram utilizados para a calogênese. Para a calogênese, foram testadas diferentes concentrações de 2,4-D ou picloram. A embriogênese somática foi iniciada utilizando sementes maduras como fonte de explantes. Os cotilédones, junto com eixos embrionários, foram introduzidos *in vitro* testando-se diferentes composições salinas (meios MS e LPM), fontes de nitrogênio (glutamina e caseína hidrolisada), várias concentrações de glutamina e de 2,4-D, tempos de exposição ao 2,4-D (até 60 dias), combinação de auxina e BAP e, finalmente, uso da polivinilpirrolidona adicionada ao meio de cultura. Para a maturação dos embriões somáticos, foram realizados tratamentos com diferentes compostos (sacarose, maltose, sorbitol, polietilenoglicol e carvão ativado), várias concentrações de polietilenoglicol 6000 ou de ácido abscísico. Para a conversão, foram testadas concentrações de GA₃ em combinação ou não com BAP. As sementes de jabuticabeira germinaram em meio WPM/2 sem sacarose. Foram obtidos calos a partir de discos foliares excisados de plântulas jovens em todos os tratamentos, com maiores porcentagens em meio contendo 2,4-D. Não houve a formação de embriões somáticos, mesmo após um ano de cultura. Em contrapartida, embriões somáticos se desenvolveram a partir de sementes maduras. Por meio de análises histológicas, foi possível observar que a morfologia das células que compõem os calos (formados de discos foliares) é compatível com àquela descrita para tecidos não-embriogênicos, em contraste com as células de aparência meristemática das massas pró-embriogênicas (formadas a partir de sementes). Após 60 dias de indução a partir de sementes, o melhor tratamento foi o meio MS, com a adição de 1000 mg.L⁻¹ de glutamina e 10 µM de 2,4-D, sem adição de BAP. O PVP reduziu a oxidação das culturas, mas não alterou a porcentagem de embriões somáticos obtidos. Após 30 dias de maturação, embriões de maior tamanho e em estádios mais avançados de desenvolvimento foram obtidos em meio contendo 60 g.L⁻¹ de PEG 6000. Não houve conversão dos embriões somáticos nos tratamentos testados, sugerindo a presença de anormalidades morfológicas. A partir de secções anatômicas, foi possível comprovar os efeitos deletérios do período prolongado de exposição ao 2,4-D, com a formação de um tecido de cicatrização no interior dos embriões somáticos. Ao contrário, embriões formados após 7 ou 15 dias de exposição ao 2,4-D não apresentaram essa estrutura. Recomenda-se a realização de novos estudos para determinar um período de exposição mínimo ao 2,4-D para a formação embriões somáticos com morfologia normal. Em conclusão, foi possível estabelecer as etapas iniciais de um protocolo de embriogênese somática de jabuticabeira, utilizando sementes maduras como fontes de explantes.

Palavras-chave: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Análise histológica. Discos foliares. Massas pró-embriogênicas. Sementes maduras. Tecido de cicatrização.

ABSTRACT

Plinia peruviana ("jaboticaba") is a Myrtaceae species native to Brazil, important due to the taste and medicinal properties of its fruits. Among the micropropagation techniques, somatic embryogenesis can be used to obtain a large number of plants in a short period of time. Two types of explants were used in order to establish a somatic embryogenesis protocol of the species. Plants were germinated *in vitro* in WPM or WPM/2 medium, in the presence or absence of 30 g.L⁻¹ sucrose, and leaf discs were used for callogenesis in the presence of different concentrations of 2,4-D or picloram. Somatic embryogenesis was initiated using mature seeds as source of explants. The cotyledons, with embryony axes, were introduced *in vitro* in media containing different saline compositions (MS and LPM media), nitrogen sources (glutamine and hydrolyzed casein), various concentrations of glutamine and 2,4-D, 2,4-D exposure times (up to 60 days), auxin and BAP combination and, finally, polyvinylpyrrolidone. For somatic embryos maturation, treatments with different compounds (sucrose, maltose, sorbitol, polyethylene glycol and activated carbon), various concentrations of polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) or of abscisic acid were tested. For embryo conversion, concentrations of GA₃ were tested, combined or not with BAP. Jaboticaba seeds germinated in WPM/2 medium without sucrose. Callus was obtained from leaf discs of young seedlings in all treatments, with higher percentages in medium containing 2,4-D. There was no formation of somatic embryos, even after one year of culture. In contrast, somatic embryos developed from mature seeds. Through the use of histological analysis, it was possible to observe that the morphology of the cells that form the callus (obtained from leaf discs) is compatible with that described for non-embryogenic tissues, in contrast to the cells of meristem appearance of the pro-embryogenic masses (obtained from seeds). After 60 days of induction from seeds, the best treatment was the MS medium, supplemented with 1000 mg.L⁻¹ of glutamine and 10 μM of 2,4-D, without BAP. PVP reduced the oxidation of the cultures, but did not modify the percentage of somatic embryos obtained. After 30 days of maturation, embryos of larger size and in more advanced stages of development were obtained in medium containing 60 g.L⁻¹ of PEG 6000. The somatic embryos did not convert in any treatments, suggesting the presence of morphological abnormalities. From the anatomical sections, it was possible to prove the deleterious effects of prolonged exposure to 2,4-D, with the formation of a cicatrization tissue in the somatic embryos. On the other hand, embryos formed after 7 or 15 days of exposure to 2,4-D did not present this structure. New studies are recommended to determine a minimum period of 2,4-D treatment for the formation of somatic embryos with normal morphology. In the present study, it was possible to establish the initial stages of a somatic embryogenesis protocol of jaboticaba, by using mature seeds as source of explants.

Keywords: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. Cicatrization tissue. Histological analysis. Leaf discs. Mature seeds. Proembryogenic masses.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - Germinação <i>in vitro</i> de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i> (Poir.) Govaerts) e calogênese a partir de discos foliares.....	35
FIGURA 1 – Germinação <i>in vitro</i> e calogênese em discos foliares de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>).....	46
FIGURA 2 – Morfoanatomia de calo formado a partir de discos foliares de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>).....	49
CAPÍTULO 2 - Embriogênese somática a partir de sementes maduras de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i> (Poir.) Govaerts).....	57
FIGURA 1 – Processo de desinfestação e introdução <i>in vitro</i> de sementes de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>)	62
FIGURA 2 – Indução de massas pró-embriogênicas de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>), 60 dias após introdução <i>in vitro</i> em meio MS com diferentes concentrações de 2,4-D e fontes de nitrogênio	71
FIGURA 3 – Indução de massas pró-embriogênicas de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>), 60 dias após introdução <i>in vitro</i> em meio MS contendo diferentes concentrações de glutamina	75
FIGURA 4 – Formação de massas pró-embriogênicas e embriões somáticos de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>), 60 dias após introdução <i>in vitro</i> em meio MS contendo diferentes combinações de 2,4-D e BAP	79
FIGURA 5 – Indução de massas pró-embriogênicas de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>), 30 dias após introdução <i>in vitro</i> em meio MS com diferentes concentrações de PVP	81
FIGURA 6 – Maturação de embriões somáticos de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>), 30 dias após transferência das massas pró-embriogênicas para meio MS contendo diferentes compostos	84
FIGURA 7 – Maturação de ES de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>), 30 dias após transferência para meio MS contendo diferentes concentrações de PEG 6000	87

FIGURA 8 – Maturação de ES de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>), 30 dias após transferência para meio MS contendo diferentes concentrações de ácido abscísico (ABA)	90
FIGURA 9 – Cultura de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>), 60 dias após introdução <i>in vitro</i> em meio MS com diferentes tempos de exposição a 10 µM de 2,4-D	93
FIGURA 10 – Desenvolvimento dos embriões somáticos de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>) em meio MS sem reguladores, 60 dias após o término dos tratamentos de indução utilizando 2,4-D	95
FIGURA 11 – Morfoanatomia de calo formado a partir de sementes maduras de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>)	97
FIGURA 12 – Análise histológica de embriões de jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>) formados em período prolongado de 2,4-D (A-C-E) e tratamento reduzido de exposição ao 2,4-D (B-D-F)	101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Germinação *in vitro* de jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts) e calogênese a partir de discos foliares.....35

TABELA 1 – Germinação *in vitro* e Contaminação de sementes de jabuticabeira (*Plinia peruviana*) conforme meio de cultura e presença ou ausência de sacarose, 120 dias após introdução *in vitro*.....43

TABELA 2 – Germinação *in vitro* e Contaminação de sementes de jabuticabeira (*Plinia peruviana*) conforme meio de cultura e presença ou ausência de luz, 120 dias após introdução *in vitro*44

TABELA 3 – Formação de calos a partir de discos foliares de jabuticabeira (*Plinia peruviana*), conforme tipo e concentração de auxina (2,4-D ou picloram) adicionada ao meio de cultura MS, 60 dias após introdução *in vitro*..45

TABELA 4 – Formação de calos a partir de discos foliares de jabuticabeira (*Plinia peruviana*), de acordo com a concentração de 2,4-D e face da folha em contato com meio de cultura MS, 60 dias após introdução *in vitro*.....47

CAPÍTULO 2 - Embriogênese somática a partir de sementes maduras de jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts).....57

TABELA 1 – Experimentos de indução de massas pró-embriogênicas (mpe) de jabuticabeira (*Plinia peruviana*), fontes de variação testadas e número de repetições63

TABELA 2 – Experimentos de maturação das culturas embriogênicas de jabuticabeira (*Plinia peruviana*) e fontes de variação testadas64

TABELA 3 – Formação de calos, massas pró-embriogênicas (MPE) e massas contendo embriões somáticos (ES) em culturas de jabuticabeira (*Plinia peruviana*), conforme meio de cultura e vitaminas, 60 dias após introdução *in vitro*68

TABELA 4 – Formação de calos, massas pró-embriogênicas (MPE) e massas contendo embriões somáticos (ES) em culturas de jabuticabeira (*Plinia*

peruviana), conforme concentração de 2,4-D e fonte de nitrogênio adicionada ao meio de cultura MS, 60 dias após introdução *in vitro*..70

- TABELA 5 – Formação de calos, massas pró-embriogênicas (MPE), massas contendo embriões somáticos (ES), explantes com raízes (ER) e de eixos embrionários germinados (EG) em culturas de jabuticabeira (*Plinia peruviana*) conforme concentração de glutamina adicionada ao meio de cultura MS contendo 10 µM de 2,4-D, 60 dias após introdução *in vitro*73
- TABELA 6 – Formação de calos, massas pró-embriogênicas (MPE), massas contendo embriões somáticos (ES), explantes contendo raízes (ER) e eixos embrionários germinados (EG) em culturas de jabuticabeira (*Plinia peruviana*), conforme concentração de 2,4-D adicionada ao meio de cultura MS, 60 dias após introdução *in vitro*.....76
- TABELA 7 – Formação de massas pró-embriogênicas (MPE) e massas contendo embriões somáticos (ES) em culturas de jabuticabeira (*Plinia peruviana*), conforme concentração de 2,4-D e de BAP adicionados ao meio de cultura MS, 60 dias após introdução *in vitro*78
- TABELA 8 – Formação de calos, massas pró-embriogênicas (MPE), massas contendo embriões somáticos (ES), explantes contendo raízes (ER), eixos embrionários germinados (EG) e explantes oxidados (OXID) em cultura de jabuticabeira (*Plinia peruviana*), conforme concentração de polivinilpirrolidona adicionada ao meio de cultura MS contendo 10 µM de 2,4-D, 60 dias após introdução *in vitro*80
- TABELA 9 – Maturação de embriões somáticos de jabuticabeira (*Plinia peruviana*) conforme composto adicionado ao meio de cultura MS, 30 dias após transferência para meio de maturação83
- TABELA 10 – Maturação de embriões somáticos de jabuticabeira (*Plinia peruviana*) conforme concentração de polietilenoglicol (PEG 6000), 30 dias após transferência para meio de maturação86
- TABELA 11 – Maturação de embriões somáticos de jabuticabeira (*Plinia peruviana*) conforme concentração de ácido abscísico (ABA), 30 dias após transferência para meio de maturação88

TABELA 12 – Formação de calos, massas pró-embriogênicas (MPE), massas contendo embriões somáticos (ES), explantes com raízes (ER) e eixos embrionários germinados (EG) em culturas de sementes de jabuticabeira (*Plinia peruviana*), conforme tempo de exposição a 10 μ M 2,4 D em meio de cultura MS, 60 dias após introdução *in vitro*.....92

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	– Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2-iP	– 2-Isopenteniladenina
ABA	– Ácido abscísico
AIA	– Ácido indolacético
AIB	– Ácido indol-3-butírico
ANA	– Ácido 1-naftaleno acético
ANOVA	– Análise de variância
BAP	– 6-Benzilaminopurina
CA	– Carvão ativado
CH	– Caseína hidrolisada
CV	– Coeficiente de variação
ES	– Embrião somático
GA3	– Ácido giberélico
GLUT	– L-glutamina
IVG	– Índice de Velocidade de Germinação (conforme MAGUIRE, 1962)
LPm	– Meio LP (<i>“leaf protoplast”</i> ; VON ARNOLD; ERIKSSON, 1977) modificado por von Arnold e Eriksson (1981)
MALT	– Maltose
MB	– Meio base
MPE	– Massa pró-embriogênica
MS	– Meio desenvolvido por Murashige e Skoog (1962)
PEG	– Polietilenoglicol
PEG 6000	– Polietilenoglicol de massa molecular 6000
Picloram	– Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PPM™	– Biocida <i>“Plant Preservative Mixture”</i>
PVP	– Polivinilpirrolidona
SAC	– Sacarose
SORB	– Sorbitol
WPM	– <i>“Woody Plant Medium”</i> (LLOYD; McCOWN, 1980)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 A família Myrtaceae e a jabuticabeira (<i>Plinia peruviana</i>).....	19
2.2 Embriogênese somática	21
2.2.1 Iniciação das culturas embriogênicas.....	22
2.2.2 Proliferação das massas embriogênicas	24
2.2.3 Pré-maturação e maturação dos embriões somáticos	25
2.2.4 Conversão dos embriões somáticos em plântulas	26
2.3 Análises histológicas aplicadas a embriogênese somática em plantas.....	27
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 1 - GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE JABUTICABEIRA (<i>Plinia peruviana</i> (POIR.) GOVAERTS) E CALOGÊNESE A PARTIR DE DISCOS FOLIARES	35
RESUMO.....	35
CHAPTER 1 - <i>IN VITRO</i> GERMINATION OF JABUTICABEIRA (<i>Plinia peruviana</i> (POIR.) GOVAERTS) AND CALLOGENESIS FROM LEAF DISCS	36
ABSTRACT.....	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 LOCAL DE ESTUDO	39
2.2 MATERIAL VEGETAL	39
2.3 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	39
2.4 CALOGÊNESE	40
2.4.1 Efeito de diferentes concentrações de auxinas	40
2.4.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e posições dos explantes no meio de cultura.....	41

2.5 CONDIÇÕES DE CULTURA.....	41
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
2.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	43
3.2 CALOGÊNESE.....	44
3.2.1 Efeito de diferentes concentrações de auxinas	44
3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e posições do explante no meio de cultura	47
3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	48
4 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS.....	51
CAPÍTULO 2 - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE SEMENTES MADURAS DE JABUTICABEIRA (<i>Plinia peruviana</i> (POIR.) GOVAERTS)	57
RESUMO.....	57
CHAPTER 2 - SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM MATURE SEEDS OF JABUTICABEIRA (<i>Plinia peruviana</i> (POIR.) GOVAERTS)	58
ABSTRACT.....	58
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 LOCAL DE ESTUDO.....	61
2.2 MATERIAL VEGETAL E DESINFESTAÇÃO	61
2.3 MEIO DE CULTURA	62
2.4 INICIAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS APÓS PERÍODO PROLONGADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 2,4-D.....	62
2.4.1 Experimentos de indução	62
2.4.2 Manutenção e proliferação das massas pró-embriogênicas	63

2.4.3	Maturação das culturas	64
2.4.4	Conversão dos embriões somáticos	64
2.5	INICIAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS EM VÁRIOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO 2,4-D	65
2.5.1	Indução de massas pró-embriogênicas em diferentes tempos de exposição ao 2,4-D	65
2.5.2	Manutenção e proliferação das massas pró-embriogênicas	65
2.6	CONDIÇÕES DE CULTURA.....	65
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
2.8	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	66
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1	INICIAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS APÓS PERÍODO PROLONGADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 2,4-D.....	67
3.1.1	Indução de massas pró-embriogênicas.....	67
3.1.1.1	Efeito de diferentes composições de sais e vitaminas do meio de cultura	68
3.1.1.2	Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e concentrações de 2,4-D	69
3.1.1.3	Efeito de diferentes concentrações de glutamina	73
3.1.1.4	Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D.....	76
3.1.1.5	Efeito de diferentes combinações de BAP e 2,4-D.....	78
3.1.1.6	Efeito de diferentes concentrações de polivinilpirrolidona	80
3.1.2	Manutenção e proliferação das massas pró-embriogênicas	82
3.1.3	Maturação das culturas	82
3.1.3.1	Maturação em diferentes compostos	82
3.1.3.2	Maturação em diferentes concentrações de PEG 6000	85
3.1.3.3	Maturação em diferentes concentrações de ácido abscísico	88
3.1.4	Conversão dos embriões somáticos	89
3.2	INICIAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS EM VÁRIOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO 2,4-D	91

3.2.1 Indução de massas pró-embriogênicas em diferentes tempos de exposição ao 2,4-D	91
3.2.2 Manutenção e proliferação das massas pró-embriogênicas	94
3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	96
3.3.1 Indução de massas pró-embriogênicas após período prolongado de 2,4-D	98
3.3.2 Indução de massas pró-embriogênicas em tratamento reduzido de exposição ao 2,4-D	100
4 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS.....	104
CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
REFERÊNCIAS.....	117
ANEXO 1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS MS E LPM	130
ANEXO 2 - COMPOSIÇÃO DE VITAMINAS DOS MEIOS MS E DE MOREL E WETMORE.....	130
ANEXO 3 - RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA (ANOVA)	131

1 INTRODUÇÃO GERAL

A jabuticabeira-de-cabinho (*Plinia peruviana*) é uma planta arbórea pertencente à família Myrtaceae. A espécie é nativa do Brasil e de distribuição restrita às regiões Sudeste e Sul do país, desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (ALMEIDA-TEIXEIRA et al., 2011; DUARTE; PAULL, 2015). A jabuticabeira produz frutos de sabor doce, baixa acidez e aroma agradável, de aparência e textura similar às uvas, mas com uma casca mais grossa, de cor roxa escura a preta (LANDRUM, 1986; BARROS et al., 1996; ABE et al., 2012; WU et al., 2012 e 2013; DUARTE, PAULL, 2015). Existem poucos cultivos comerciais da espécie e a maior parte da produção é restrita a pequenas propriedades rurais (LANDRUM, 1986; ALMEIDA-TEIXEIRA et al., 2011; DUARTE; PAULL, 2015).

De maneira similar a outros frutos de cor escura, a jabuticaba é rica em compostos fenólicos, incluindo antocianinas, flavonoides e elagitaninos (SOUZA-MOREIRA et al., 2008; ABE et al., 2012; WU et al., 2012, 2013; CALLONI et al., 2015). Essas substâncias conferem às jabuticabas diversas propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-carcinogênica, antiviral, antidiabética, antidepressiva e cardioprotetora (SOUZA-MOREIRA et al., 2008; ABE et al., 2012; WU et al., 2012, 2013; BORGES et al., 2014).

A jabuticabeira apresenta uma produtividade elevada mesmo sem utilização de práticas de manejo e sua principal forma de propagação é por meio de sementes (PEREIRA et al., 2005; CASSOL et al., 2015). Jabuticabeiras originadas por via seminífera, porém, apresentam um longo período de juvenilidade, podendo se estender por até 15 anos, além da alta variabilidade genética (CASSOL et al., 2015). Ademais, as sementes de jabuticabeira são classificadas como recalcitrantes, ou seja, perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas (VALIO; FERREIRA, 1992; DANNER et al., 2011; DUARTE, PAULL, 2015). Nessas sementes, ocorre poliembrionia, ou seja, é possível obter mais de uma plântula por semente (ALEXANDRE et al., 2006; HÖSSEL et al., 2013). Segundo Hössel et al. (2013), algumas destas plântulas são geneticamente idênticas à planta-mãe.

Não existem estudos relacionados à seleção, cultivo e uso de ferramentas biotecnológicas para o aumento da produtividade e otimização das propriedades bioativas de seus frutos (WU et al., 2013; DUARTE; PAULL, 2015). Além disso, ainda não foram estabelecidos métodos eficientes de propagação vegetativa, que

assegurem a formação de pomares comerciais de jabuticabeira em curto espaço de tempo (DANNER et al., 2006). Os problemas relacionados à propagação vegetativa convencional da espécie referem-se à baixa taxa de enraizamento de estacas e ausência de estudos focando no desenvolvimento em longo prazo das mudas a campo (PEREIRA et al., 2005; DANNER et al., 2006; SASSO et al., 2010; CASSOL et al., 2015). A enxertia é atualmente o método mais viável para a propagação da espécie (DUARTE; PAULL, 2015).

O desenvolvimento de técnicas para a propagação assexuada de jabuticabeira é necessário para a formação de pomares comerciais, utilizando-se de plantas uniformes e com boas características agronômicas (CASSOL et al., 2015). A cultura de tecidos surge como alternativa para consecução de um grande número de plantas, em curto período de tempo e com boas condições fitossanitárias (GEORGE; DEBERGH, 2008). Dentre as técnicas utilizadas para a produção *in vitro* de plantas, a embriogênese somática se destaca por ser aplicável a praticamente qualquer espécie, desde que com protocolo eficiente, e por permitir a produção de embriões e plântulas semelhantes aos originados a partir de embriões zigóticos (VON ARNOLD et al., 2002).

Na família Myrtaceae, existem relatos de protocolos de embriogênese somática para as espécies *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996a, 1996b; GUERRA et al., 2001; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004, 2007b, 2014; FRAGA et al., 2012), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999), *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007) e *Psidium guajava* (RAI et al., 2007; AKHTAR, 2010; BAJPAI et al., 2016). Contudo, ainda não foram relatados protocolos de embriogênese somática para a jabuticabeira-de-cabinho (*Plinia peruviana*).

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção *in vitro* de plântulas de jabuticabeira-de-cabinho (*Plinia peruviana*), a partir do processo de embriogênese somática, utilizando folhas obtidas de plântulas recém-germinadas e sementes maduras, juntamente com a caracterização histológica das estruturas obtidas na cultura *in vitro*.

A tese está organizada em dois capítulos. O primeiro focando na formação de calos a partir de discos foliares de plântulas jovens de *P. peruviana*. No segundo, o processo de embriogênese somática utilizando sementes maduras da espécie como fonte de explantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A FAMÍLIA MYRTACEAE E A JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*)

A família Myrtaceae apresenta distribuição predominantemente pantropical e subtropical, incluindo cerca de 130 gêneros e 4000 espécies e constituindo uma das maiores famílias da flora brasileira (SOUZA; LORENZI, 2008). Todas as espécies brasileiras de Myrtaceae pertencem à tribo Myrteae (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

Do ponto de vista taxonômico, Myrtaceae é uma das mais complexas famílias botânicas, devido ao grande número de espécies e escassez de estudos taxonômicos (SOUZA; LORENZI, 2008). Diversas espécies frutíferas pertencem a esta família, mas seu plantio em escala comercial ainda é inexpressivo e depende da domesticação por meio de técnicas agrônômicas. A jabuticabeira (*Plinia peruviana*) faz parte do grupo de plantas, dentro das Myrtaceae, que apresentam potencial horticultural. Entretanto, essa espécie permanece apreciada apenas como planta silvestre, sendo comercializada em pequena escala (SOUZA; LORENZI, 2008).

O gênero *Plinia* L. ocorre desde a América Central e Caribe até o Brasil (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). No Brasil, distribui-se em parte do Norte e Nordeste, Mato Grosso do Sul e todos os estados do Sudeste e Sul do país (SOBRAL et al., 2015).

A jabuticabeira “de cabinho” (*Plinia peruviana*), tendo como sinônimo *P. trunciflora*, é uma espécie nativa do Brasil, de distribuição restrita às regiões Sudeste e Sul do país, desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (SOARES-SILVA, 2000; SOBRAL et al., 2015). A árvore atinge cerca de 6 m e apresenta tronco reto, com 60 cm de diâmetro, com súber quebradiço de castanho a cinza-esverdeado. A espécie apresenta floração entre outubro e janeiro, com frutificação em outubro. Seus frutos pedicelados a diferem das outras espécies do gênero *Plinia*, sendo *P. peruviana* frequente em floresta, no meio de campos, beira de rios e áreas alagadas (SOARES-SILVA, 2000).

A jabuticabeira apresenta uma produtividade elevada mesmo sem utilização de práticas de manejo e sua principal forma de propagação é por meio de sementes. Porém, jabuticabeiras originadas por via seminífera apresentam um longo período de

juvenilidade, podendo se estender por até 15 anos (PEREIRA et al., 2005; CASSOL et al., 2015). Esse fator é altamente limitante para sua produção em larga escala.

A jabuticabeira apresenta poliembriõnia, sendo possível obter mais de uma plântula a partir de uma única semente (ALEXANDRE et al., 2006; HÖSSEL et al., 2013). Nas sementes poliembriônicas, há um embrião zigótico, resultando da fecundação, e um ou mais embriões assexuais, formados por apomixia (DANNER et al., 2011).

Além disso, as sementes de jabuticabeira são classificadas como recalcitrantes, ou seja, seu armazenamento é limitado (VALIO; FERREIRA, 1992; DANNER et al., 2011; DUARTE; PAULL, 2015). Segundo Bewley et al. (2013), sementes recalcitrantes não suportam a desidratação, perdendo a viabilidade rapidamente quando armazenadas. As sementes de jabuticabeira perdem a capacidade germinativa com 31% de umidade ou menos (VALIO; FERREIRA, 1992). Enquanto todas as sementes germinam caso sejam imediatamente plantadas, o armazenamento dentro do fruto durante 20 dias reduz a germinação para 10%, e o armazenamento por um mês resulta em completa ausência de germinação (VALIO; FERREIRA, 1992).

Por ser a jabuticabeira uma espécie não domesticada, os bancos de germoplasma são restritos a instituições de pesquisa e não existe a delimitação de clones com características agronômicas superiores (CITADIN et al., 2010). Além disso, a escassez de programas de melhoramento está associada à alta variabilidade e diversidade genética das populações. São necessários estudos, principalmente no âmbito tecnológico, englobando biologia molecular, formas de reprodução, caracterização de germoplasma e propagação vegetativa da jabuticabeira (CITADIN et al., 2010).

Segundo Danner et al. (2006), ainda não estão estabelecidos métodos eficientes de propagação vegetativa, que assegurem a formação de pomares comerciais da espécie em curto espaço de tempo. Os problemas relacionados à propagação vegetativa da jabuticabeira são a baixa taxa de enraizamento das estacas (até 40%) (PEREIRA et al., 2005). Os alporques apresentam porcentagem de enraizamento mais altas, chegando a 100%, porém o desenvolvimento posterior das mudas não foi estudado (DANNER et al., 2006; CASSOL et al., 2015). No caso da enxertia, a porcentagem de pegamento atinge cerca de 70%, porém é bastante

variável dependendo da época do ano e não foi verificada a evolução no crescimento e frutificação a campo (SASSO et al., 2010).

Para Cassol et al. (2015), o desenvolvimento de técnicas para a propagação assexuada da jabuticabeira é necessário para a produção precoce de frutos, rápida propagação de genótipos superiores e, conseqüentemente, redução do custo das mudas.

2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas, sob condições adequadas, se diferenciam em embriões somáticos que se assemelham morfológicamente a embriões de origem zigótica, posteriormente se desenvolvendo em uma planta completa (ZIMMERMAN, 1993; VON ARNOLD et al., 2002; YANG; ZHANG, 2010). Embriões somáticos são estruturas bipolares que apresentam os órgãos típicos dos embriões zigóticos (radícula, hipocótilo e cotilédones), além de seus estádios característicos de desenvolvimento (ZIMMERMAN, 1993; LITZ; GRAY, 1995; DODEMAN et al., 1997; VON ARNOLD et al., 2002).

O sistema de embriogênese somática pode ser utilizada como sistema modelo em estudos dos eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem durante a embriogênese em plantas (ZIMMERMAN, 1993; VON ARNOLD et al., 2002; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006; YANG; ZHANG, 2010). Contudo, sua maior importância reside na propagação clonal em larga escala de espécies difíceis de propagar por métodos convencionais (MERKLE; DEAN, 2000; VON ARNOLD et al., 2002; GIRI et al., 2004; KUMAR; VAN STADEN, 2017). A capacidade de produzir um grande número de clones de genótipos elite é ainda mais expressiva no caso de espécies lenhosas, geralmente recalcitrantes às técnicas convencionais de propagação (MERKLE; DEAN, 2000; ISAH, 2016). Finalmente, a embriogênese somática pode ser aplicada em biorreatores, produção de sementes sintéticas, transformação genética, criopreservação e estabelecimento de bancos de germoplasma (MERKLE; DEAN, 2000; VON ARNOLD et al., 2002; GIRI et al., 2004; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

Como um processo universal, a embriogênese somática teoricamente pode ser induzida em qualquer espécie vegetal, desde que sejam otimizados o tipo de explante, meio de cultura e condições ambientais (LITZ; GRAY, 1995; VON ARNOLD et al.,

2002). O início da embriogênese somática envolve células somáticas diferenciadas que adquirem competência embriogênica (YANG; ZHANG, 2010). A competência embriogênica está restrita a algumas células, que são capazes de se desdiferenciar em resposta aos reguladores vegetais, estresse e outras condições de cultura (FEHÉR, 2005). Tais células competentes proliferam e posteriormente se diferenciam em embriões somáticos (ISAH, 2016).

O potencial embriogênico é altamente dependente do genótipo utilizado para iniciar as culturas (FEHÉR, 2005). Na família Myrtaceae, a técnica da embriogênese somática foi aplicada com sucesso nas espécies *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999), *Psidium guajava* (RAI et al., 2007; AKHTAR, 2010; BAJPAI et al., 2016), *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007) e *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996a, 1996b; GUERRA et al., 2001; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004, 2007b, 2014; FRAGA et al., 2012). Além disso, *Acca sellowiana* é considerada uma espécie de referência para estudo de embriogênese somática em plantas lenhosas, de característica recalcitrante (GUERRA et al., 2001). Dessa forma, a técnica poderia ser aplicada para contornar os problemas de propagação vegetativa da jabuticabeira, de maneira a obter grande número de mudas em curto período de tempo.

Conforme Von Arnold (2008), a regeneração de plantas via embriogênese somática inclui cinco etapas: 1. Iniciação das culturas embriogênicas; 2. Proliferação das culturas embriogênicas; 3. Pré-maturação dos embriões; 4. Maturação dos embriões somáticos; e 5. Regeneração das plantas.

2.2.1 Iniciação das culturas embriogênicas

Durante a embriogênese somática, certas células diferenciadas adquirem competência embriogênica e proliferam como células embriogênicas (VON ARNOLD et al., 2002; YANG; ZHANG, 2010; ISAH, 2016). As auxinas são conhecidas por mediar a transição de células somáticas a embriogênicas, a partir da reprogramação de genes envolvidos na embriogênese (ZIMMERMAN, 1993; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006; MÖLLER; WEIJERS, 2009; YANG; ZHANG, 2010). Portanto, as auxinas são os principais agentes utilizados para induzir a embriogênese somática (DODEMAN et al., 1997; MÖLLER; WEIJERS, 2009).

O herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um composto sintético análogo às auxinas (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006), comumente utilizado em protocolos de embriogênese somática para várias espécies (GAJ, 2004; FEHÉR, 2005; ISAH, 2016). No caso das Myrtaceae, o 2,4-D foi aplicado com sucesso em culturas de *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996b; GUERRA et al., 2001; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007b; FRAGA et al., 2012), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999), *Psidium guajava* (AKHTAR, 2010; BAJPAI et al., 2016) e *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007).

A auxina picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) também pode ser utilizada durante a indução de culturas embriogênicas, com resultados semelhantes aos obtidos com 2,4-D. Para *Myrtus communis*, o picloram induziu a formação de embriões somáticos em concentrações de até 16 µM (CANHOTO et al., 1999).

Além das auxinas, outros fitorreguladores também podem estar envolvidos na embriogênese (LITZ; GRAY, 1995; FEHÉR, 2005; DE SMET et al., 2010). Baixas concentrações de cinetina foram utilizadas em combinação com o 2,4-D para estimular a iniciação da embriogênese em *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990). Por outro lado, para *Psidium guajava*, apenas o 2,4-D resultou na produção de embriões somáticos, enquanto os outros reguladores testados foram ineficientes (AKHTAR, 2010).

Diferentes componentes como a polivinilpirrolidona (PVP), água de coco e formas reduzidas de nitrogênio (caseína hidrolisada e glutamina) podem ser usados em combinação com reguladores para induzir a embriogênese somática (GIRI et al., 2004). Segundo Yang e Zhang (2010), formas reduzidas de nitrogênio apresentam propriedades reconhecidas durante a indução e desenvolvimento dos embriões. A glutamina, por exemplo, pode levar a bons resultados em relação ao número de embriões somáticos formados em culturas de embriões zigóticos de *Acca sellowiana* (DAL VESCO; GUERRA, 2001) e *Psidium guajava* (BAJPAI et al., 2016).

A necessidade de auxinas e outros reguladores para a iniciação da embriogênese somática é altamente determinada pelo estágio de desenvolvimento e tipo de explante utilizado (ZIMMERMAN et al., 1993; VON ARNOLD et al., 2002; GAJ, 2004; FEHÉR, 2005; ISAH, 2016). Embriões zigóticos imaturos são os explantes mais comuns devido ao seu estado embriogênico, principalmente para espécies lenhosas (NOLAN; ROSE, 2010; ISAH, 2016). Tecidos jovens, de plantas recém-germinadas, são mais fáceis de se trabalhar em relação aos embriões zigóticos e ainda se

apresentam em estágio juvenil, o que facilita a indução dos embriões somáticos (LITZ; GRAY, 1995; FEHÉR, 2005; NOLAN; ROSE, 2010). Dentre as Myrtaceae, a iniciação de culturas embriogênicas é normalmente realizada a partir de embriões zigóticos, como para *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996b; GUERRA et al., 2001; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004, 2007b, 2014; FRAGA et al., 2012) e *Psidium guajava* (AKHTAR, 2010, BAJPAI et al., 2016). Além disso, embriões zigóticos maduros de *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999) e cotilédones de *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007) foram utilizados como explantes. Na família Myrtaceae, não há relatos de embriogênese somática realizada a partir de tecidos adultos (CANHOTO; CRUZ, 1996a), com exceção do uso de estruturas florais em *Acca sellowiana* (STEFANELLO et al., 2005; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007a).

2.2.2 Proliferação das massas embriogênicas

Uma vez que as células embriogênicas são formadas, elas continuam a proliferar na forma de massas pró-embriogênicas (MPE) (VON ARNOLD et al., 2002; YANG; ZHANG, 2010). Segundo Isah (2016), as MPEs também podem ser chamadas de calos embriogênicos, massas embriogênicas, calos embriogênicos friáveis ou massas embriogênicas em estágio pré-globular. Normalmente, é fácil diferenciar calos não embriogênicos de MPEs, conforme sua morfologia e cor (VON ARNOLD et al., 2002). As características utilizadas para essa diferenciação variam de espécie para espécie e podem ser confirmadas por estudos histológicos (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

Massas pró-embriogênicas podem proliferar em meio de cultura semelhante ao utilizado para a iniciação das culturas (LITZ; GRAY, 1995; VON ARNOLD et al., 2002). As culturas embriogênicas de algumas espécies podem ser mantidas por longos períodos de tempo em meio de cultura contendo os reguladores vegetais utilizados durante a indução, principalmente auxinas, retendo seu potencial embriogênico (LITZ; GRAY, 1995; VON ARNOLD et al., 2002). Em algumas espécies, outros reguladores vegetais podem ser adicionados durante a fase de proliferação, como as citocininas BAP e zeatina (CORREDOIRA et al., 2003). Além disso, fontes de nitrogênio podem ser adicionadas ao meio de cultura para estimular a proliferação das massas pró-embriogênicas (CARLSSON et al., 2017). Algumas Myrtaceae, como

Myrciaria aureana, retêm a capacidade de produzir embriões somáticos mesmo após dois anos de cultura em ciclos sucessivos de multiplicação *in vitro* (MOTOIKE et al., 2007). Em *Myrtus communis*, porém, o potencial embriogênico é perdido após oito semanas de cultivo (CANHOTO et al., 1999).

2.2.3 Pré-maturação e maturação dos embriões somáticos

As auxinas têm importância conhecida durante a iniciação de MPEs, porém apresentam efeito inibitório na continuidade dos estádios embriogênicos (ZIMMERMAN, 1993; LITZ; GRAY, 1995). Portanto, na pré-maturação é necessário transferir as MPEs para meio de cultura sem adição desse tipo de regulador (VON ARNOLD et al., 2002). Assim, o silenciamento da expressão de genes necessários para a transição dos embriões somáticos aos estádios posteriores é removido (ZIMMERMAN, 1993). Para *Acca sellowiana*, por exemplo, caso seja ultrapassado um período de 16 semanas em presença do regulador auxínico, ocorrem anormalidades no desenvolvimento dos embriões somáticos (GUERRA et al., 2001).

Durante a maturação, os embriões somáticos passam por diversas mudanças bioquímicas e morfológicas, semelhantes às modificações que ocorrem nos embriões zigóticos (DODEMAN et al., 1997; VON ARNOLD et al., 2002). Nessa fase, normalmente o meio de cultura é suplementado com aminoácidos e outros compostos orgânicos (LITZ; GRAY, 1995). O acúmulo de produtos de reserva que ocorre durante a maturação é necessário para a subsequente conversão dos embriões somáticos em plântulas (VON ARNOLD et al., 2002). A síntese de proteínas e acúmulo de reservas estão relacionados ao estresse hídrico e, em algumas espécies, podem ser induzidos a partir da adição de ácido abscísico (ABA) ao meio de cultura (ZIMMERMAN, 1993; VON ARNOLD et al., 2002). Além disso, o ABA é usado para reduzir a embriogênese secundária e inibir a germinação precoce (VON ARNOLD et al., 2002).

A maturação dos embriões é geralmente concluída quando ocorre o suficiente armazenamento de reservas e perda gradual de água, que pode ser induzida com a adição de agentes osmóticos ao meio de cultura (MERKLE et al., 1995; VON ARNOLD et al., 2002). Os agentes osmóticos podem ser permeáveis ou não permeáveis (ATTREE; FOWKE, 1993; VON ARNOLD et al., 2002).

A baixa massa molecular dos agentes osmóticos permeáveis permite que estes atravessem a parede celular rapidamente. Assim, ocorre plasmólise temporária

nas células, até que essa substância retorne ao citosol e a disponibilidade hídrica não é reduzida em longo prazo. Porém, estes agentes podem apresentar certo grau de toxicidade e causar efeitos negativos às culturas (ATTREE; FOWKE, 1993). Além de osmóticos permeáveis, a maltose e a sacarose também são fontes de carboidratos, podendo estimular a proliferação e desenvolvimento dos embriões somáticos (JALALI et al., 2017).

Por outro lado, o polietilenoglicol pertence à classe dos osmóticos não permeáveis. Devido ao seu alto peso molecular, estas substâncias levam à redução da pressão de turgor nas células sem atravessar a parede celular, levando a uma condição de estresse hídrico permanente (ATTREE; FOWKE, 1993; JALALI et al., 2017). Nesse caso, a disponibilidade hídrica é reestabelecida a partir do aumento na concentração de solutos dentro das células, inclusive produtos de reserva como lipídios e proteínas (ATTREE; FOWKE, 1993; MISRA et al., 1993). No caso da família Myrtaceae, a aplicação de PEG em culturas de *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007) e *Psidium guajava* (BAJPAI et al., 2016) estimulou o desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos.

2.2.4 Conversão dos embriões somáticos em plântulas

Em geral, a conversão em plântulas ocorre apenas em embriões somáticos de morfologia normal e que acumularam quantidades suficientes de produtos de reserva (VON ARNOLD et al., 2002). Para diversas espécies, a conversão é o estágio crítico para o estabelecimento de um protocolo eficiente (GAJ, 2004; BAJPAI et al., 2016).

Em alguns casos, uma auxina ou citocinina pode ser utilizada para estimular a conversão dos embriões somáticos (VON ARNOLD et al., 2002). A conversão de embriões de *Myrciaria aureana*, por exemplo, foi realizada em meio contendo ácido indol-3-butírico (AIB) (MOTOIKE et al., 2007). Por outro lado, em culturas de *Psidium guajava*, a conversão ocorreu em meio sem adição de reguladores (RAI et al., 2007; AKHTAR, 2010).

Para a conversão em espécies de Myrtaceae, frequentemente são utilizadas citocininas em combinação com ácido giberélico (GA₃). Segundo Cruz et al. (1990), o GA₃ resulta na quebra da dormência dos embriões somáticos. Em *Myrtus communis*, o uso de GA₃ isoladamente ou em combinação com 6-benzilaminopurina (BAP) foi

eficiente para a conversão dos embriões somáticos (CANHOTO et al., 1999). Em *Acca sellowiana*, a citocinina utilizada juntamente com o GA₃ foi a cinetina (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994) ou BAP (CANHOTO; CRUZ, 1996a).

Finalmente, quando as plântulas apresentam tamanho suficiente, elas podem ser transferidas para o ambiente *ex vitro* (VON ARNOLD et al., 2002). Essa transição pode ser uma fase delicada, uma vez que grande parte das plântulas obtidas *in vitro* morre durante a aclimatização (BAJPAI et al., 2016). No entanto, em alguns casos esta fase não representa um problema. A porcentagem de sobrevivência em *Psidium guajava*, por exemplo, varia de 80 a 100% (RAI et al., 2007; BAJPAI et al., 2016).

2.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS APLICADAS A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM PLANTAS

Análises histoquímicas e histológicas contribuem significativamente para a caracterização de eventos morfológicos que levam a protocolos de embriogênese somática eficientes (YEUNG, 1999; RAMOS et al., 2014; ROCHA et al., 2016). Contudo, a maioria dos estudos que descrevem protocolos de cultura *in vitro* não contempla a caracterização histológica do processo (DOBROWOLSKA et al., 2017). Essas análises podem ser aplicadas para classificar o processo de embriogênese como direto ou indireto, identificar a origem uni ou multicelular dos embriões somáticos e comparar os embriões obtidos *in vitro* com os de origem zigótica (MICHAX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992; CORREDOIRA et al., 2006; RAMOS et al., 2014).

Análises histocitológicas também podem ser utilizadas para determinar se as estruturas obtidas são embriões bem formados, anormais ou imaturos (MICHAX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992). Ademais, é possível descrever a sequência de eventos morfológicos envolvidos na ontogênese de espécies cujos embriões somáticos são considerados anômalos, como os de *Acca sellowiana* (CANHOTO; CRUZ, 1996b; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004; PESCADOR et al., 2008). O conhecimento de aspectos histológicos durante a cultura *in vitro* é necessário para compreender os processos de regeneração (WOO; WETZSTEIN, 2008) e pode ser explorado para desenvolver e otimizar protocolos de embriogênese somática (CORREDOIRA et al., 2006). A baixa porcentagem de embriões capazes de se desenvolver em plântulas não pode ser explicada simplesmente pela falta de

adequação do meio de indução, mas, a partir do uso da histologia como guia, é possível levantar hipóteses, sugerir experimentos e melhorias nas condições de cultura (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992; YEUNG, 1999).

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1679-1687, 2012.
- AKHTAR, N. Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 556-562, 2010.
- ALEXANDRE, R. S.; WAGNER JÚNIOR, A.; NEGREIROS, J. R. S.; BRUCKER, C. H. Estádio de maturação dos frutos e substratos na germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 2, p. 227-230, 2006.
- ALMEIDA-TEIXEIRA, G. H.; BERLINGIERI DURIGAN, M. F.; DURIGAN, J. F. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. [Myrtaceae]). In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits**. New Dehli: Woodhead Publishing, 2011. p. 246-274.
- ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 1-35, 1993.
- BAJPAI, A.; KALIM, S.; CHANDRA, R.; KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-12, 2016.
- BARROS, R. S.; FINGER, F. L.; MAGALHÃES, M. M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v. 66, p. 209-215, 1996.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HIHLHORST, H. W. M; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3ed. New York: Springer, 2013.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014.
- CALLONI, C.; AGNOL, R. D.; MARTÍNEZ, L. S.; MARCON, F. S.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International**, v. 70, p. 15-22, 2015.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33-40, 2004.

- CANGAHUALA-INOCENTE, C. G.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 87-89, 2007a.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; TORRES, A. C.; GUERRA, M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 228-234, 2007b.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C. A.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** (Plant), v. 50, p. 166-175, 2014.
- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** (Plant), v. 30, n. 1, p. 21-25, 1994.
- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. *Feijoa sellowiana* Berg (pineapple guava). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry 35. **Trees IV**. New Delhi: Springer, 1996a. p. 155-171.
- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). **Protoplasma**, v. 191, p. 34-45, 1996b.
- CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 13-21, 1999.
- CARLSSON, J.; SVENNERSTAM, H.; MORITZ, T.; EGERTSDOTTER, U.; GANETEG, U. Nitrogen uptake and assimilation in proliferating embryogenic cultures of Norway spruce – Investigating the specific role of glutamine. **Plos One**, v. 12, n. 8, 2017.
- CASSOL, D. A.; WAGNER JÚNIOR, A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I. Embalagem, época e ácido indolbutírico na propagação de jaboticabeira por alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 267-272, 2015.
- CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticaba trees (*Plinia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343, 2010.
- CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. **Annals of Botany**, v. 92, p. 129-136, 2003.
- CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; VIEITEZ, A. M. Morphological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** (Plant), v. 42, p. 525-533, 2006.

CRUZ, G. S.; CANHOTO, J. M.; ABREU, M. A. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, v. 66, p. 263-270, 1990.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 19-25, 2001.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JÚNIOR, A. A.; ASSMANN, A. P.; MAZARO, S. M.; DONAZZOLO, J.; SASSO, S. A. Z. Enraizamento de jabuticabeira (*Plinia trunciflora*) por mergulhia aérea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 530-532, 2006.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; AMBRÓSIO, R.; WAGNER JÚNIOR, A. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 246-252, 2011.

DE SMET, I.; LAU, S.; MAYER, U.; JÜRGENS, G. Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. **The Plant Journal**, v. 61, p. 959-970, 2010.

DOBROWOLSKA, I.; ANDRADE, G. M.; CLAPHAM, D.; EGERTSDOTTER, U. Histological analysis reveals the formation of shoots rather than embryos in regenerating cultures of *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 2, p. 319-326, 2017.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G. KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 313, p. 1493-1509, 1997.

DUARTE, O.; PAULL, R. E. Myrtaceae. In: DUARTE, O.; PAULL, R. E (Eds.). **Exotic fruits and nuts of the new world**. CABI Publishing, 2015. p. 51-95.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (Eds.) **Somatic embryogenesis**, vol. 2, Plant cell monographs. Heidelberg: Springer, 2005. p. 85-101.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G. A.; SPUDEIT, D. A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 2165-2176, 2012.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.

GEORGE, E. F. DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, v. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v. 18, p. 115-135, 2004.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; DOS REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.

HÖSSEL, C.; OLIVEIRA, J. S. M. A.; FABIANE, K. C.; WAGNER JÚNIOR, A.; CITADIN, I. Conservação e teste de tetrazólio em sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 255-261, 2013.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, p. 1-22, 2016.

JALALI, M. A.; SIRMANDI, H. B.; HATAMZADEH, A. Effects of carbohydrate source and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos in walnut (*Juglans regia* L.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 29-35, 2017.

KUMAR, V.; VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 194, p. 1-17, 2017.

LANDRUM, L. R. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinum* and *Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica Monograph**, v. 45, p. 1-178, 1986.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, n.4, p. 508-536, 1997.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 416-425 1995.

MERKLE, S. A.; DEAN, J. F. D. Forest tree biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 298-302, 2000.

MICHAUX-FERRIÈRE, N; SCHWENDIMAN, J. Histology of somatic embryogenesis. In: DATTÉE, Y.; DUMAS, C.; GALLAIS, A. (Eds.). **Reproductive biology and plant breeding**: Biologie de la Reproduction et Amélioration des Plantes. Springer: Berlin, 1992. p. 247-260.

MISRA, S.; ATTREE, S. M.; LEAL, I.; FOWKE, L. C. Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. **Annals of Botany**, v. 71, p. 11-22, 1993.

MÖLLER, B.; WEIJERS, D. Auxin control of embryo patterning. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, 2009.

- MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.
- NOLAN, K. E.; ROSE, R. J. Plant regeneration – somatic embryogenesis. *In*: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture**. Wiley-Blackwell, 2010. p. 39-60.
- PEREIRA, M.; OLIVEIRA, A. L.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Efeitos de substratos, valores de pH, concentrações de AIB no enraizamento de estacas apicais de jabuticabeira [*Myrciaria jabuticaba* (Vell.) O. Berg.]. **Scientia Forestalis**, v. 69, p. 84-92, 2005.
- PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.
- QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006.
- RAI, M. K.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 129-133, 2007.
- RAMOS, R. S.; MELO, E. F.; MELO, C. G.; RODRIGUES, C. R.; VIEIRA, M. S.; BARBOSA, M. H. P. The use of histological analysis for the detection of somatic embryos in sugarcane. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 762-767, 2014.
- ROCHA, D. I.; KURCZYNSKA, E.; POTOCKA, I.; STEINMACHER, D. A.; OTONI, W. C. Histology and histochemistry of somatic embryogenesis. *In*: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: fundamental aspects and applications**. Switzerland: Springer Press, 2016. p. 471-494.
- SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jabuticabeira por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 577-583, 2010.
- SOARES-SILVA, L. H. **A família Myrtaceae - subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil**. 478 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae *In* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB37142>).
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2ª ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2008.

- SOUZA-MOREIRA, T. M.; MOREIRA, R. D.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 48-53, 2008.
- STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 117-126, 2005.
- VALIO, I. F. M.; FERREIRA, Z. Germination of seeds of *Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 2, p. 95-98, 1992.
- VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.
- VON ARNOLD, S. Somatic embryogenesis *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 335-354.
- WOO, S. M.; WETZSTEIN, H. Y. Morphological and histological evaluations of in vitro regeneration in *Elliottia racemosa* leaf explants induced on media with thidiazuron. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, n. 2, p. 167-172, 2008.
- WU, S. B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7513-7525, 2012.
- WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, p. 148-159, 2013.
- YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 29, p. 36-57, 2010.
- YEUNG, E. C. The use of histology in the study of plant tissue culture systems - some practical comments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant)**, v. 35, p. 137-143, 1999.
- ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.

CAPÍTULO 1
GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana* (POIR.)
GOVAERTS) E CALOGÊNESE A PARTIR DE DISCOS FOLIARES

RESUMO

Plinia peruviana é uma Myrtaceae nativa do Brasil, importante devido às propriedades de seus frutos comestíveis. A embriogênese somática pode ser um método eficiente para sua propagação clonal em larga escala. O objetivo do trabalho foi estabelecer um método eficiente de germinação *in vitro* e um protocolo de calogênese a partir de folhas jovens, bem como caracterizar os calos formados utilizando análises histológicas. Frutos foram despulpados e as sementes obtidas foram utilizadas para a germinação *in vitro* na qual foram testadas duas concentrações salinas (WPM e WPM/2), na presença ou ausência de 30 g.L⁻¹ de sacarose. Para a indução de massas embriogênicas, discos foliares foram excisados das plântulas crescidas *in vitro* e introduzidos em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações (2,5; 5 ou 10 µM) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou picloram. Em um segundo experimento de indução, foram testadas concentrações maiores de 2,4-D (10, 20, 30 ou 40 µM). Após 120 dias, a germinação foi superior em meio sem sacarose (66%), se comparada com meio suplementado com este açúcar (32%). Além disso, a ausência de sacarose resultou em menor porcentagem de contaminação das culturas (3,8% em relação a 18,3% na presença do glicídio). Não foi verificada diferença na porcentagem de germinação e contaminação dos explantes entre os meios WPM e WPM/2. O Índice de Velocidade de Germinação não variou, independente dos meios testados. Após 60 dias de cultivo em tratamento de indução, ocorreu a formação de calos a partir dos discos foliares em todos os tratamentos testados. As maiores porcentagens de calogênese foram obtidas nos meios de cultura contendo 10 µM de 2,4-D. O aumento na concentração para até 40 µM não resultou em maior porcentagem de formação de calos, porém não causou a inibição da calogênese. Independentemente do tratamento, não ocorreu formação de embriões somáticos a partir de calos originados de discos foliares. Mediante análise histológica, foi possível verificar que os calos apresentaram células parenquimáticas grandes, desorganizadas e vacuoladas. Conclui-se que a germinação *in vitro* das sementes dessa espécie pode ser realizada em meio WPM/2 destituído de sacarose, alcançando até 68% de taxa de germinação. A calogênese a partir de discos foliares ocorre em meio de cultura suplementado com 10 µM de 2,4-D, porém as células dos calos formados não apresentam características embriogênicas.

Palavras-chave: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Análise histológica. Índice de Velocidade de Germinação. Picloram.

CHAPTER 1
IN VITRO GERMINATION OF JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana* (POIR.)
GOVAERTS) AND CALLOGENESIS FROM LEAF DISCS

ABSTRACT

Plinia peruviana is a Myrtaceae species native to Brazil, important due to the properties of its edible fruits. Somatic embryogenesis may be an efficient method for its large-scale vegetative propagation. The objective of this study was to establish an efficient *in vitro* germination method and a callogenesis protocol from young leaves, as well as to characterize callus formation using histological analysis. Fruits were deoated and the seeds were used for *in vitro* germination. Two media concentrations (WPM and WPM/2) were tested for seed germination, in the presence or absence of 30 g.L⁻¹ sucrose. For the proembryogenic masses induction, leaf discs were excised from *in vitro* growth seedlings and introduced into MS culture medium containing different concentrations (2.5, 5 or 10 µM) of 2,4-D or picloram. In a second induction experiment, higher concentrations of 2,4-D (10, 20, 30 or 40 µM) were tested. After 120 days, the germination was higher in medium without sucrose (66%), when compared with medium with sugar (32%). In addition, the absence of sucrose resulted in a lower percentage of culture contamination (3.8% compared to 18.3% in the presence of sucrose). There was no difference in the percentage of germination and contamination between WPM and WPM/2 media. Germination Speed Index did not vary in any of the treatments tested. After 60 days in induction medium, callus formation was observed in all the treatments tested. The highest means were obtained in culture media containing 10 µM of 2,4-D. The increase of 2,4-D up to 40 µM did not result in a higher percentage of callus formation, nor did cause inhibition of callogenesis. Regardless of the treatment, there was no somatic embryo formation from calli originating from leaf discs of jaboticabeira. The histological analysis of the calli showed the presence of large, disorganized and vacuolized parenchymatic cells. It is concluded that *in vitro* germination of this species can be achieved in WPM/2 medium in the absence of sucrose, reaching a germination rate up to 68%. Callogenesis from leaf discs occurs in a culture medium supplemented with 10 µM 2,4-D, but the masses have no embryogenic characteristics.

Keywords: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. Germination Speed Index. Histological analysis. Picloram.

1 INTRODUÇÃO

A jabuticabeira “de cabinho” (*Plinia peruviana*) é uma Myrtaceae nativa do Brasil, distribuída desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (ALMEIDA-TEIXEIRA et al., 2011; DUARTE; PAULL, 2015). Seus frutos saborosos são apreciados *in natura* ou na forma de geleias, sucos, vinhos e licores (CITADIN et al., 2010; ALMEIDA-TEIXEIRA et al., 2011; DUARTE; PAULL, 2015). Jabuticabas são ricas em compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides e elagitaninos (SOUZA-MOREIRA et al., 2008; ABE et al., 2012; WU et al., 2012, 2013; CALLONI et al., 2015), por isso apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiabéticas, entre outras (SOUZA-MOREIRA et al., 2008; ABE et al., 2012; WU et al., 2012, 2013; BORGES et al., 2014).

O cultivo desta espécie é normalmente restrito a propriedades rurais (ALMEIDA-TEIXEIRA et al., 2011; DUARTE; PAULL, 2015). Sua produção comercial é escassa e limitada a certas regiões do Brasil e não existem programas de melhoramento, caracterização de germoplasma ou seleção de genótipos elite da espécie (CITADIN et al., 2010). A jabuticabeira é propagada por via seminífera (PEREIRA et al., 2005; CASSOL et al., 2015). A natureza recalcitrante de suas sementes, contudo, limita seu armazenamento (VALIO; FERREIRA, 1992; DANNER et al., 2011; DUARTE; PAULL, 2015) e, conseqüentemente, sua propagação em larga escala.

A propagação vegetativa dessa espécie por meio de estaquia não apresenta resultados satisfatórios devido à baixa taxa de enraizamento, alcançando até 40% (PEREIRA et al., 2005). No caso da alporquia, os resultados de enraizamento são satisfatórios, porém não foi avaliado o posterior pegamento das mudas e desenvolvimento a campo (DANNER et al., 2006; CASSOL et al., 2015). Além disso, a porcentagem de enraizamento dos alporques é bastante variável, sendo nula em mais da metade do ano (CASSOL et al., 2015). Atualmente, a enxertia é o método mais viável para a propagação vegetativa da espécie, porém seus resultados são bastante variáveis dependendo da época do ano (SASSO et al., 2010; DUARTE; PAULL, 2015). A porcentagem de brotações obtidas varia de 48 a 68%, com especial redução em época de frutificação, e não foram realizados testes em longo prazo para constatar a compatibilidade e evolução do crescimento das mudas (SASSO et al., 2010).

O desenvolvimento de métodos eficientes de propagação vegetativa da jabuticabeira é necessário para obtenção de grande número de plantas uniformes em curto período de tempo e com características agrônomicas favoráveis (CASSOL et al., 2015). Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática pode ser uma alternativa para a propagação massal da jabuticabeira, resultando em grande número de plantas clonais obtidas em curto intervalo de tempo (GEORGE; DEBERGH, 2008). Além disso, pode ser aplicada a qualquer espécie, desde que com um protocolo adequado (VON ARNOLD et al., 2002).

A capacidade de produzir embriões somáticos pode ser correlacionada com o grau de poliembrionia *in vivo* apresentado pela espécie (MITRA; CHATURVEDI, 1972). Em *Citrus*, por exemplo, sugere-se uma relação entre os genes expressos em cultivares que apresentam poliembrionia e aqueles expressos durante a embriogênese somática (NAKANO et al., 2013). As sementes de jabuticabeira exibem poliembrionia (ALEXANDRE et al., 2006; HÖSSEL et al., 2013), assim essa espécie pode apresentar tendência a formar embriões somáticos *in vitro*.

A embriogênese somática é altamente dependente do tecido utilizado como explante inicial (FEHÉR, 2005; CORREDOIRA et al., 2012). Explantes excisados a partir de tecidos juvenis, particularmente aqueles obtidos de plântulas, são normalmente responsivos (KAHIA et al., 2016). Esses tecidos possuem elevada capacidade de proliferação e desdiferenciação celular devido ao seu estado ativo de crescimento (CORREDOIRA et al., 2015). Como apontado por Kahia et al. (2016), a produção de embriões somáticos a partir de explantes foliares oferece diversas vantagens, por ser uma fonte abundante de explantes, facilmente renovável e de material uniforme. Para as espécies da família Myrtaceae, *Eucalyptus globulus* e *E. saligna* x *E. maidenii*, foi relatado o uso de folhas obtidas de culturas pré-estabelecidas *in vitro* para a iniciação de culturas embriogênicas (CORREDOIRA et al., 2015). O uso de explantes foliares obtidos de plântulas crescidas *in vitro* também foi relatado para *Quercus rubra* (RANCILLAC et al., 1996), *Drimiopsis kirkii* (LAN et al., 2009) e *Coffea arabica* (KAHIA et al., 2016).

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um método eficiente de germinação *in vitro* e calogênese para jabuticabeira (*Plinia peruviana*), utilizando folhas obtidas de plântulas crescidas *in vitro* como fonte de explantes. Além disso, foi caracterizar os calos formados em relação ao seu potencial embriogênico, a partir de análises histológicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos de germinação *in vitro* e calogênese foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal, enquanto as análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal, ambos localizados no Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná.

2.2 MATERIAL VEGETAL

Frutos de jaboticabeira foram adquiridos no Mercado Municipal de Curitiba (PR) e despoldados manualmente. Em um mesmo fruto, foi possível obter de uma a três sementes, em média. Foram observadas sementes de diferentes tamanhos, havendo poliembrião.

A mucilagem aderida às sementes foi removida com o auxílio de uma espátula de metal. Quando necessário, as sementes foram armazenadas dentro de sacos de papel, em geladeira, por até 24 horas antes da introdução *in vitro*.

2.3 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

Sementes de jaboticaba foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, utilizando-se etanol 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sódio 5%, acrescido de 0,01% de Tween-20®, por 10 minutos. Em seguida, foram enxaguadas no mínimo três vezes em água destilada autoclavada. As sementes permaneceram em solução a 1% de polivinilpirrolidona (PVP), para evitar a oxidação durante a inoculação.

As sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio com 15 cm de altura e 2,5 de diâmetro, contendo 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) ou WPM/2 (metade da concentração de sais), acrescido ou não de 30 g.L⁻¹ de sacarose. Antes da autoclavagem, foi adicionado 0,1% de PPM™ (*Plant Preservative Mixture*) ao meio, sendo gelificado com 6 g.L⁻¹ de ágar (Vetec®). O pH foi ajustado para 5,8, com NaOH ou HCl, e o meio autoclavado a 120°C por 20 minutos.

As sementes foram mantidas em sala de crescimento na ausência ou presença de luz, durante 120 dias. A porcentagem de contaminação das culturas foi avaliada após 30 dias. A porcentagem de sementes germinadas e o IVG (Índice de velocidade de germinação) foram avaliados diariamente até 120 dias após a introdução *in vitro*. O IVG foi calculado seguindo-se a equação proposta por Maguire (1962).

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Em que:

t_i : tempo entre o início do experimento e a i -ésima observação (em dias);

n_i : número de sementes que germinam no tempo t_i ;

k : último dia da observação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um arranjo trifatorial, considerando-se a composição salina (WPM ou WPM/2), a presença ou ausência de sacarose, e a presença ou ausência de luz. Para cada tratamento, foram utilizadas 18 repetições.

2.4 CALOGÊNESE

2.4.1 Efeito de diferentes concentrações de auxinas

Plântulas com 60 dias obtidas da etapa de germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes para a indução de embriogênese somática (FIGURA 1A). A partir de cada folha, dois discos foliares com 0,5 cm de diâmetro foram excisados (um disco basal e um apical), mantendo-se a nervura mediana. Os discos foram introduzidos com sua face abaxial em contato com meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) nas concentrações de 2,5; 5 ou 10 μM (FIGURA 1B). Os discos foram cultivados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro por 2,5 cm de

altura contendo 30 mL de meio de cultura e seladas com filme de PVC e repicados para meio idêntico a cada 30 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um arranjo bifatorial, considerando-se o regulador vegetal utilizado (2,4-D ou picloram) e a concentração (2,5; 5 ou 10 μM). Para cada um dos seis tratamentos, foram utilizadas dez repetições. Cada unidade experimental consistiu em uma placa de Petri contendo oito discos foliares. Após 60 dias, foi avaliada a porcentagem de formação de calos.

2.4.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e posições dos explantes no meio de cultura

Em um segundo experimento foram testadas diferentes concentrações de 2,4-D (10, 20, 30 ou 40 μM) em meio de cultura MS. Os discos foliares foram posicionados com sua face abaxial ou adaxial voltada para o meio de cultura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um arranjo bifatorial, conforme a concentração de 2,4-D utilizada e a posição da folha em contato com o meio de cultura. Para cada um dos oito tratamentos, foram utilizadas 24 repetições. Cada unidade experimental consistiu em uma placa de Petri contendo 8 discos foliares. Após 60 dias de cultivo, foi avaliada a porcentagem de formação de calos.

2.5 CONDIÇÕES DE CULTURA

As sementes inoculadas para germinação *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento a 20°C de noite e 24 \pm 2°C de dia, sob fotoperíodo de 16h, sob luz fluorescente de tipo branca fria com DFFF (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) de aproximadamente 15 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os discos foliares utilizados para os experimentos de calogênese foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, porém no escuro.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram repetidos uma vez, exceto o teste de germinação, que foi repetido duas vezes. Os dados foram submetidos ao teste de

Bartlett para avaliação da homogeneidade e, em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida pela comparação de médias a partir do Teste SNK a 5% de probabilidade. O software estatístico utilizado para as análises foi o Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016).

2.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Calos obtidos a partir de discos foliares foram coletados após seis meses de cultura. Os calos foram fixados em solução de Karnovsky (1965). As amostras foram desidratadas em série etanólica e foram armazenadas em etanol 70%. As amostras foram infiltradas em resina de metacrilato (Technovit-7100) e, posteriormente, seccionadas com espessura de 5 μm em micrótomo rotativo (Olympus CUT 4055) e coradas com azul de toluidina 0,12% em bórax 5%. As lâminas foram montadas com água e visualizadas em microscópio (Olympus EX41) com câmera acoplada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

A germinação *in vitro* das sementes de jabuticabeira iniciou-se após 20 dias, sendo observada mais de uma plântula germinada por semente (poliembrião). Após 120 dias, em média 55% das sementes germinaram, sem diferença significativa entre os meios de cultura utilizados (TABELA 1; ANEXOS 3.1 e 3.2). A média obtida para o IVG foi 0,023, sem diferença significativa para nenhuma variável testada (meio de cultura, presença de sacarose ou luz), indicando que a germinação das sementes ocorreu em velocidade semelhante independente do tratamento.

Em relação à concentração salina, não houve diferença estatística para o uso do meio de cultura WPM ou WPM/2 na porcentagem de germinação e contaminação de sementes de jabuticabeira. A baixa exigência de nutrientes pode ser explicada pela presença de produtos de reserva na semente, que permitem a germinação e estabelecimento inicial da plântula (BEWLEY et al., 2013).

TABELA 1 – GERMINAÇÃO *IN VITRO* E CONTAMINAÇÃO DE SEMENTES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) CONFORME MEIO DE CULTURA E PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE SACAROSE, 120 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

MEIO DE CULTURA	% GERMINAÇÃO			% CONTAMINAÇÃO		
	0 g.L ⁻¹ SAC	30 g.L ⁻¹ SAC	Média	0 g.L ⁻¹ SAC	30 g.L ⁻¹ SAC	Média
WPM	64,4 aB	31,1 aA	47,7	5,5	16,6	11,1 ^{ns}
WPM/2	67,7 aB	34,4 aA	51,1	2,2	20,0	11,1 ^{ns}
Média	66,1	32,7	55,0	3,8 b	18,3 a	11,1

Médias seguidas pela mesma letra, em uma mesma variável, não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas para linhas e minúsculas para colunas. ^{ns} não significativo. Média de três ensaios independentes. SAC – sacarose.

A contaminação das sementes foi maior em meio de cultura contendo sacarose (média 18,3%) em relação ao meio sem a adição desse glicídio (média 3,8%). Além disso, a ausência da sacarose no meio resultou em aumento da porcentagem de germinação média das sementes para 66%, se comparada a 32% em meio com sacarose. A sacarose reduz o potencial hídrico do meio de cultura, restringindo a quantidade de água absorvida pela semente (BEWLEY et al., 2013). Desta forma, a embebição e consequente emergência da radícula são dificultadas

(POPINIGIS, 1985; BEWLEY et al., 2013). A ausência de carboidratos também estimula a mobilização de substâncias de reserva, estimulando a germinação (BOREK et al., 2012).

Não houve diferença entre as porcentagens de germinação, contaminação e IVG em relação à presença ou ausência de luz (TABELA 2). Dentre as Myrtaceae, o comportamento de germinação em relação à luminosidade é bastante variável, havendo ou não o requerimento de luz. Como observado no presente trabalho com *Plinia peruviana*, *Campomanesia xanthocarpa* também foi indiferente à presença ou ausência de luz no processo germinativo (SANTOS et al., 2004). De maneira geral, a maioria dos representantes da família apresenta resposta fotoblástica positiva, como acontece em *Acca sellowiana*, *Myrcianthes pungens*, *Psidium cattleianum* (SANTOS et al., 2004) e *P. guajava* (SUGAHARA; TAKAKI, 2004). Ao contrário, espécies como *Campomanesia pubescens* (DOUSSEAU et al., 2011) são classificadas como fotoblásticas negativas e apresentaram inibição da germinação na presença de luz.

TABELA 2 – GERMINAÇÃO *IN VITRO* E CONTAMINAÇÃO DE SEMENTES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) CONFORME MEIO DE CULTURA E PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LUZ, 120 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

MEIO DE CULTURA	% GERMINAÇÃO			% CONTAMINAÇÃO		
	Luz	Escuro	Média	Luz	Escuro	Média
WPM	48,9	46,7	47,7 ^{ns}	14,4	7,8	11,1 ^{ns}
WPM/2	47,8	54,4	51,1 ^{ns}	6,7	15,6	11,1 ^{ns}
Média	48,3 ^{ns}	50,5 ^{ns}	49,4	10,6 ^{ns}	11,7 ^{ns}	11,1

Médias seguidas pela mesma letra, em uma mesma variável, não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas para linhas e minúsculas para colunas. ^{ns} não significativo. Média de três ensaios independentes.

3.2 CALOGÊNESE

3.2.1 Efeito de diferentes concentrações de auxinas

A formação de calos nos discos foliares iniciou-se após 30 dias de cultura e, após 60 dias, uma média de 24% dos discos foliares apresentavam calos, especialmente na nervura mediana e na região do corte (FIGURA 1C). Em relação à morfologia externa dos calos, estes exibiram aparência mucilaginosa e compacta. A coloração dos calos foi bastante variável conforme os tratamentos. Os calos obtidos

em meio de cultura contendo 2,4-D exibiram coloração esbranquiçada ou amarela clara, enquanto aqueles obtidos em meio contendo picloram apresentaram coloração marrom escuro a preta.

Houve interação entre os fatores testados e, de maneira geral, maiores porcentagens de formação de calos foram obtidas em meio de cultura contendo 10 μM de 2,4-D (TABELA 3; ANEXOS 3.3; FIGURA 1D). Além disso, calos provenientes do meio de indução contendo picloram não se desenvolveram durante os subcultivos, apresentando coloração escurecida e tamanho menor do que os calos obtidos em meio contendo 2,4-D (FIGURA 1E).

TABELA 3 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE DISCOS FOLIARES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), CONFORME TIPO E CONCENTRAÇÃO DE AUXINA (2,4-D OU PICLORAM) ADICIONADA AO MEIO DE CULTURA MS, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

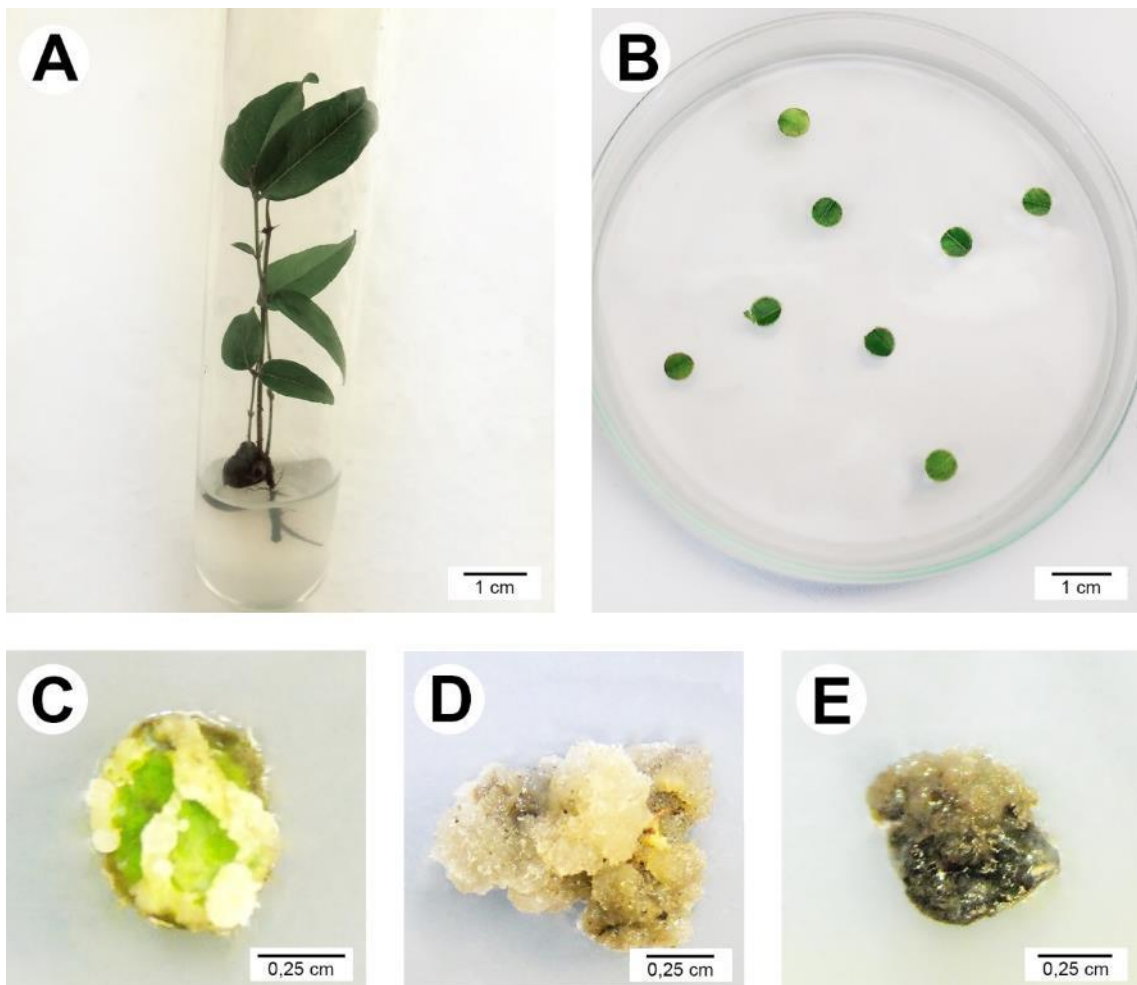
CONCENTRAÇÃO DA AUXINA (μM)	% CALOGÊNESE	
	2,4-D	PICLORAM
2,5	27,5 abA	15,0 aA
5	22,5 bA	22,5 aA
10	42,5 aA	13,7 aB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna, e letra maiúscula em uma mesma linha não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. Média de dois ensaios independentes.

Em testes preliminares, discos foliares introduzidos em meio de cultura na ausência de reguladores não resultaram na formação de calos. Para a iniciação de culturas embriogênicas, normalmente o explante é introduzido em meio de cultura contendo uma auxina (ZIMMERMAN, 1993; MERKLE et al., 1995; VON ARNOLD, 2008; NOLAN; ROSE, 2010). As auxinas estimulam a formação de massas pró-embriogênicas (MPE), que são grupos de células competentes à formação de embriões somáticos (ES) (NOLAN; ROSE, 2010). Dentre os reguladores auxínicos, o 2,4-D é o mais eficiente para indução de ES na maioria das espécies (DUNSTAN et al., 1995; NOLAN; ROSE, 2010; ISAH, 2016). O picloram, ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido 3-indolacético (AIA) também são utilizados, em menor escala, para a iniciação das culturas embriogênicas (DUNSTAN et al., 1995; NOLAN; ROSE, 2010).

Ao contrário do presente trabalho, em *Myrtus communis*, o 2,4-D e o picloram resultaram em porcentagens semelhantes de indução de ES (CANHOTO et al., 1999). O efeito positivo do picloram na indução de embriões somáticos a partir de folhas jovens também foi relatado em culturas de *Eucalyptus globulus* (CORREDOIRA et al., 2015). Para *Acca sellowiana*, o uso de 2,4-D para a formação de ES apresentou resultados superiores do que quando AIB ou ANA foram adicionados ao meio de indução (CRUZ et al., 1990). No caso dessa espécie de Myrtaceae, o 2,4-D é a auxina mais utilizada durante a embriogênese somática (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996b; GUERRA et al., 2001).

FIGURA 1 – GERMINAÇÃO *IN VITRO* E CALOGÊNESE EM DISCOS FOLIARES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*). A - PLÂNTULA, 60 DIAS APÓS GERMINAÇÃO EM MEIO WPM NA AUSÊNCIA DE REGULADORES E SACAROSE; B - DISCOS FOLIARES DE 0,5 CM DE DIÂMETRO EXCISADOS DE PLÂNTULA. C - INÍCIO DA FORMAÇÃO DE CALOS EM DISCO FOLIAR, ESPECIALMENTE NA REGIÃO DA NERVURA MEDIANA E DO CORTE; D - CALOS COM 90 DIAS, FORMADO EM MEIO CONTENDO 5 μ M DE 2,4-D; E- CALO FORMADO EM MEIO CONTENDO 5 μ M DE PICLORAM.



FONTE: O autor (2017)

3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e posições do explante no meio de cultura

No experimento testando maiores concentrações de 2,4-D, houve interação entre os fatores testados para a calogênese (TABELA 4; ANEXOS 3.4). Não houve diferença entre as concentrações de 2,4-D testadas quando a face adaxial da folha foi colocada em contato com o meio de cultura. No entanto, com a face abaxial em contato com o meio, a concentração de 10 μM de 2,4-D resultou na menor média de calogênese. De acordo com Gahan e George (2008), a orientação pode ser particularmente importante quando folhas são utilizadas como explantes na cultura de tecidos. De maneira geral, a face adaxial da folha em contato com o meio resultou em maiores porcentagens de calogênese de jabuticabeira, da mesma forma que em culturas de *Quercus rubra* (RANCILLAC et al., 1996) e maior frequência de embriogênese somática em *Quercus alba* (CORREDOIRA et al., 2012). A condução de nutrientes e reguladores vegetais é naturalmente maior a partir da face adaxial em direção à abaxial das folhas (CORREDOIRA et al., 2012). Conforme Welander (1988), o parênquima paliçádico predominante na superfície adaxial é mais responsivo por ser o último tecido a cessar os processos de crescimento e divisão.

TABELA 4 – FORMAÇÃO DE CALOS A PARTIR DE DISCOS FOLIARES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D E FACE DA FOLHA EM CONTATO COM MEIO DE CULTURA MS, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D (μM)	POSIÇÃO DA FOLHA	
	ABAXIAL	ADAXIAL
10	36,4 bB	65,6 aA
20	63,5 aA	57,2 aA
30	42,7 abB	67,7 aA
40	57,1 abA	71,8 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna, e letra maiúscula em uma mesma linha não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. Média de dois ensaios independentes.

Em discos foliares de jabuticabeira, o uso de até 10 μM de 2,4-D no geral resultou em maiores porcentagens de formação de calos. O aumento na concentração para 40 μM não resultou em maior porcentagem de calogênese, não sendo observado efeito inibitório com as concentrações testadas. Normalmente, concentrações de 1 a

10 μM de 2,4-D são suficientes para estimular a formação de ES (VON ARNOLD, 2008). Para embriões zigóticos de *Acca sellowiana*, a concentração de 5 μM é comumente utilizada com sucesso (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996a, 1996b), mas concentrações de até 20 μM desse regulador já foram reportadas para a formação de calos embriogênicos (GUERRA et al., 2001). Para *Myrtus communis*, concentrações acima de 2 μM de 2,4-D apresentaram efeito inibitório na formação de ES (CANHOTO et al., 1999).

Independente do regulador vegetal e meio de cultura utilizados neste estudo, os calos originados a partir de discos foliares não resultaram na formação de ES, mesmo após um ano de cultura. Na maioria das espécies, a competência embriogênica está restrita a certos tecidos, principalmente os mais jovens, e decai quando se utiliza hipocótilo, pecíolo, folha ou raízes como explantes (GAJ, 2004; FEHÉR, 2005; CORREDOIRA et al., 2012). Segundo Litz e Gray (1995), tecidos juvenis são muitas vezes a única escolha quando se trata de plantas lenhosas, nas quais a transição de fase juvenil para madura está associada com processos de lignificação.

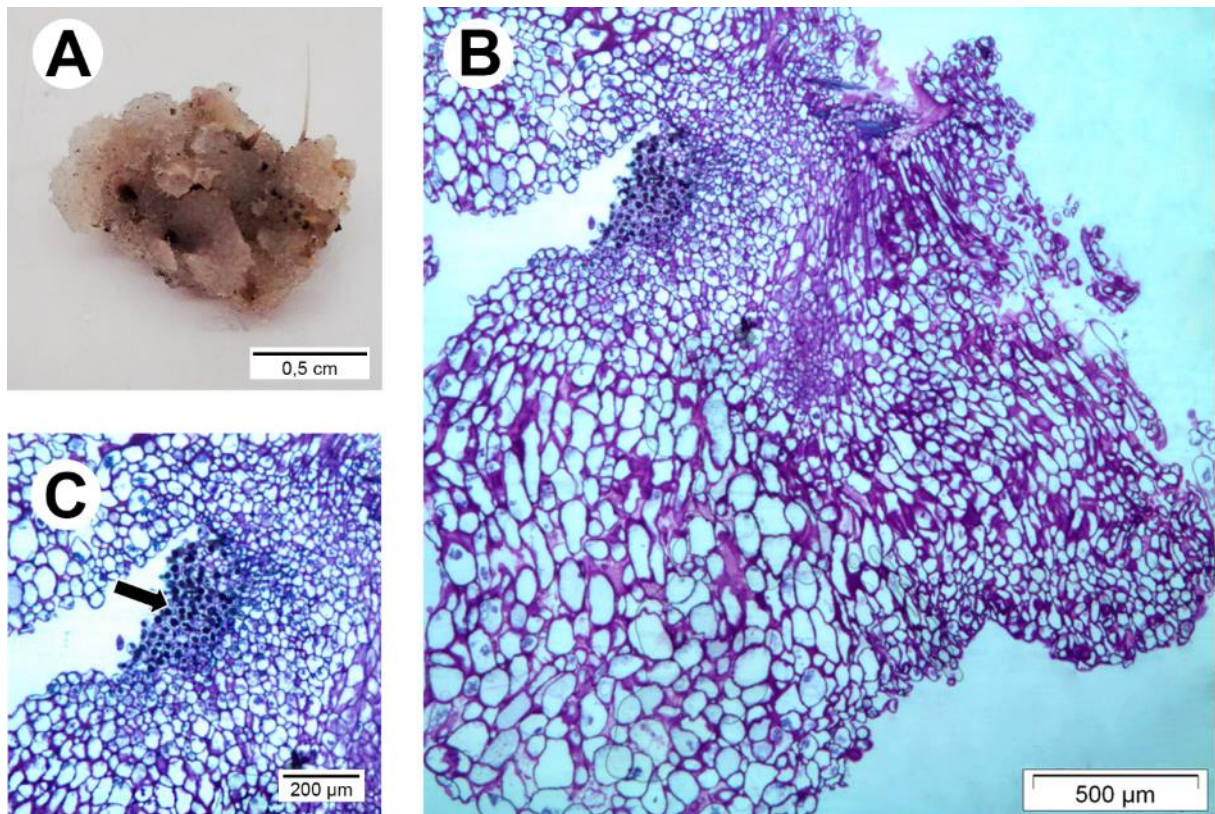
Em espécies da família Myrtaceae, a iniciação de culturas embriogênicas é normalmente realizada a partir de tecidos como embriões zigóticos (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996b; CANHOTO et al., 1999; GUERRA et al., 2001; AKHTAR, 2010, BAJPAI et al., 2016) e cotilédones (MOTOIKE et al., 2007). A indução de embriogênese somática a partir de tecidos maduros na família Myrtaceae é restrita ao uso de estruturas florais de *Acca sellowiana* (CANHOTO; CRUZ, 1996a; STEFANELLO et al., 2005; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007).

3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Em relação à morfologia externa, os calos formados a partir de folhas de jabuticabeira apresentaram textura compacta e muitas vezes acompanhados de raízes (FIGURA 2A). Em cortes histológicos, estes calos apresentaram estrutura não-embriogênica, com células parenquimáticas grandes, desorganizadas e vacuolizadas (FIGURA 2B). É possível notar a presença de compostos fenólicos em algumas regiões (FIGURA 2C, seta). Esses calos não apresentaram potencial embriogênico, não havendo a formação de embriões somáticos mesmo após 12 meses de cultura.

Calos embriogênicos e não-embriogênicos diferem não apenas em sua morfologia externa e comportamento durante a cultura *in vitro*, mas também em características celulares (SHANG et al., 2009) e fisiológicas (FEHÉR, 2005). Células grandes, com vacúolo proeminente e baixa razão núcleo/citoplasma são características de calos não-embriogênicos (SHANG et al., 2009; SILVEIRA et al., 2013).

FIGURA 2 – MORFOANATOMIA DE CALO FORMADO A PARTIR DE DISCOS FOLIARES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*). A - ASPECTO MORFOLÓGICO DE CALO NÃO EMBRIOGÊNICO FORMADO A PARTIR DE DISCO FOLIAR; B - CORTE HISTOLÓGICO DE CALO NÃO EMBRIOGÊNICO; C - DETALHE DE CALO NÃO EMBRIOGÊNICO, COM A PRESENÇA DE COMPOSTOS FENÓLICOS (SETA).



FONTE: O autor (2017)

4 CONCLUSÕES

Sementes maduras de jabuticabeira podem ser germinadas *in vitro*, em meio de cultura WPM/2 na ausência de sacarose, alcançando até 68% de taxa de germinação ao fim de 120 dias.

Discos foliares excisados das plântulas germinadas *in vitro* podem ser utilizados para a iniciação de calos em meio MS na presença de 10 μ M de 2,4-D. De maneira geral, aconselha-se posicionar os discos foliares com a face adaxial em contato com o meio de cultura, de forma a reduzir o requerimento de auxinas utilizadas durante a indução de calos.

A partir das análises histológicas, foi possível concluir que os calos obtidos a partir de folhas desta espécie apresentam características não-embriogênicas. O uso de tecidos mais jovens, tais como embriões zigóticos maduros e imaturos, pode ser uma alternativa para a iniciação da embriogênese somática dessa espécie. Além disso, recomenda-se a realização de estudos futuros para determinar o tecido de origem dos calos obtidos.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1679-1687, 2012.
- AKHTAR, N. Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 556-562, 2010.
- ALEXANDRE, R. S.; WAGNER JÚNIOR, A.; NEGREIROS, J. R. S.; BRUCKER, C. H. Estádio de maturação dos frutos e substratos na germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 2, p. 227-230, 2006.
- ALMEIDA-TEIXEIRA, G. H.; BERLINGIERI DURIGAN, M. F.; DURIGAN, J. F. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. [Myrtaceae]). In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits**. New Dehli: Woodhead Publishing, 2011. p. 246-274.
- BAJPAI, A.; KALIM, S.; CHANDRA, R.; KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-12, 2016.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HIHLHORST, H. W. M; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3ed. New York: Springer, 2013.
- BOREK, S.; PUKACKA, S.; MICHALSKI, K. Regulation by sucrose of storage compounds breakdown in germinating seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.). white lupine (*Lupinus albus* L.) and Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet.) II. Mobilization of storage lipid. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 1199-1206, 2012.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014.
- CALLONI, C.; AGNOL, R. D.; MARTÍNEZ, L. S.; MARCON, F. S.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International**, v. 70, p. 15-22, 2015.
- CANGAHUALA-INOCENTE, C. G.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 87-89, 2007.

- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. **In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant)**, v. 30, n. 1, p. 21-25, 1994.
- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. *Feijoa sellowiana* Berg (pineapple guava). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry 35. **Trees IV**. New Delhi: Springer, 1996a. p. 155-171.
- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). **Protoplasma**, v. 191, p. 34-45, 1996b.
- CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 13-21, 1999.
- CASSOL, D. A.; WAGNER JÚNIOR, A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I. Embalagem, época e ácido indolbutírico na propagação de jabuticabeira por alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 267-272, 2015.
- CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jabuticaba trees (*Plinia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343, 2010.
- CORREDOIRA, E.; SAN-JOSÉ, M. C.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* trees. **Trees**, v. 26, p. 881-891, 2012.
- CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; IBARRA, M.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoots cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* x *E. maidenii* trees. **Tree Physiology**, v. 35, n. 6, p. 378-390, 2015.
- CRUZ, G. S.; CANHOTO, J. M.; ABREU, M. A. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, v. 66, p. 263-270, 1990.
- DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JÚNIOR, A. A.; ASSMANN, A. P.; MAZARO, S. M.; DONAZZOLO, J.; SASSO, S. A. Z. Enraizamento de jabuticabeira (*Plinia trunciflora*) por mergulhia aérea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 530-532, 2006.
- DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; AMBRÓSIO, R.; WAGNER JÚNIOR, A. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 246-252, 2011.
- DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; GUIMARÃES, R. M.; LARA, T. S.; CUSTÓDIO, T. N.; CHAVES, I. S. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1362-1368, 2011.
- DUARTE, O.; PAULL, R. E. Myrtaceae. In: DUARTE, O.; PAULL, R. E. (Eds.). **Exotic fruits and nuts of the new world**. CABI Publishing, 2015. p. 51-95.

DUNSTAN, D. I.; TAUTORUS, T. E.; THORPE, T. A. Somatic embryogenesis in woody plants. *In*: THORPE, T. A. (Ed.) ***In vitro embryogenesis in plants***. Dordrecht: Springer Science, 1995. p. 471-540.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? *In*: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (Eds.) **Somatic embryogenesis**, vol. 2, Plant cell monographs. Heidelberg: Springer, 2005. p. 85-101.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious Regeneration. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, v. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 355-402.

GEORGE, E. F. DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, v. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; DOS REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.

HÖSSEL, C.; OLIVEIRA, J. S. M. A.; FABIANE, K. C.; WAGNER JÚNIOR, A.; CITADIN, I. Conservação e teste de tetrazólio em sementes de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 255-261, 2013.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, p. 1-22, 2016.

KAHIA, J.; KIRIKA, M.; LUBABALI, H.; MANTELL, S. High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaves derived from in vitro-germinated seedlings of a *Coffea arabica* hybrid cultivar. **HortScience**, v. 51, n. 9, p. 1148-1152, 2016.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

LAN, T. H.; HONG, P. I.; HUANG, C. C.; CHANG, W. C.; LIN, C. S. High-frequency direct somatic embryogenesis from leaf tissue of *Drimiopsis kirkii* Baker (giant squill). **In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant)**, v. 45, p. 44-47, 2009.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 416-425 1995.

- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.
- MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Springer Science, 1995. p. 155-204.
- MITRA, G. C.; CHATURVEDI, H. C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo*-grown emasculated flower buds of *Citrus* spp. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 99, n. 4, p. 184-189, 1972.
- MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAKANO, M.; KIGOSHI, K.; SHIMIZU, T.; ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H. OMURA, M. Characterization of genes associated with polyembryony and in vitro somatic embryogenesis in *Citrus*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, p. 795-803, 2013.
- NOLAN, K. E.; ROSE, R. J. Plant regeneration – somatic embryogenesis. In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture**. Wiley-Blackwell, 2010. p. 39-60.
- PEREIRA, M.; OLIVEIRA, A. L.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Efeitos de substratos, valores de pH, concentrações de AIB no enraizamento de estacas apicais de jaboticabeira [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg.]. **Scientia Forestalis**, v. 69, p. 84-92, 2005.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: Agiplan, 1985.
- RANCILLAC, M.; KLINGUER, A.; KLINGUER, S.; MILLET, B. Preliminary investigations on somatic embryogenesis from leaf discs of red oak (*Quercus rubra* L.). **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 67-73, 1996.
- SANTOS, C. M. R.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 2, p. 13-20, 2004.
- SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jaboticabeira por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 577-583, 2010.
- SHANG, H.; LIU, C.; ZHANG, C.; LI, F.; HONG, W.; LI, F. Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between

Agrobacterium transformed embryogenic and non-embryogenic calli of cotton. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, n. 5, p. 456-465, 2009.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SILVEIRA, V.; VITA, A. M.; MACEDO, A. F.; DIAS, M. F. R.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 114, p. 351-364, 2013.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; MOREIRA, R. D.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 48-53, 2008.

STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 117-126, 2005.

SUGAHARA, V. Y.; TAKAKI, M. Effect of light and temperature on seed germination in guava (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae). **Seed Science and Technology**, v. 32, p. 759-764, 2004.

VALIO, I. F. M.; FERREIRA, Z. Germination of seeds of *Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 2, p. 95-98, 1992.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

VON ARNOLD, S. Somatic Embryogenesis. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 335-354.

WELANDER, M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees. **Journal of Plant Physiology**, v. 132, p. 738-744, 1988.

WU, S. B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7513-7525, 2012.

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, p. 148-159, 2013.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO 2

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE SEMENTES MADURAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS)

RESUMO

A jabuticabeira (*Plinia peruviana*) é uma Myrtaceae arbórea nativa do Brasil. Seus frutos saborosos possuem propriedades medicinais, incluindo atividades anti-inflamatórias e antidiabéticas, conferindo a essa espécie uma importância cultural e econômica. Dentre as técnicas de propagação assexuada, a embriogênese somática pode ser uma alternativa para obtenção de plantas uniformes em curto intervalo de tempo. O objetivo do trabalho foi obter um protocolo de embriogênese somática de jabuticabeira e avaliar a morfologia dos embriões somáticos formados a partir de análises histológicas. Frutos de jabuticabeira foram despulpados manualmente e as sementes excisadas pela metade antes da introdução *in vitro*. Para a indução de culturas embriogênicas, foram testados diferentes composições salinas (MS e LPM), fontes de nitrogênio (glutamina e caseína hidrolisada), várias concentrações de glutamina (0, 250, 500, 750 ou 1000 mg.L⁻¹), várias concentrações de 2,4-D (2,5; 5; 10; 25 ou 50 µM), tempos de exposição ao 2,4-D (7, 15, 30, 45 ou 60 dias), combinação do regulador auxínico e BAP e, finalmente, uso da polivinilpirrolidona (PVP) em diferentes concentrações (250, 500, 750 ou 1000 mg.L⁻¹) no meio de cultura. Para a maturação dos embriões somáticos, foram realizados tratamentos com diferentes compostos (sacarose, maltose, sorbitol, polietilenoglicol 6000 e carvão ativado) e várias concentrações de polietilenoglicol 6000 (30, 60 ou 90 g.L⁻¹) ou de ácido abscísico (0,1; 0,5; 1; 5; 10 ou 50 µM). Para a conversão, foram testadas várias concentrações de GA₃ (1,44; 2,88 ou 5,77 µM) em combinação ou não com 0,5 µM de BAP. Após 60 dias, a melhor combinação de tratamentos para a indução de massas pró-embriogênicas (MPEs) foi o meio MS, com a adição de 1000 mg.L⁻¹ de glutamina e 10 µM de 2,4-D, sem adição de BAP. A citocinina mostrou-se inibitória para a formação de MPEs. Não houve diferença entre os tempos de exposição ao 2,4-D na porcentagem de indução de MPEs. Além disso, o PVP reduziu a oxidação das culturas, mas isso não resultou em maior porcentagem de MPEs ou embriões somáticos formados. Após 30 dias de maturação em meio de cultura contendo 60 g.L⁻¹ de PEG 6000, foram obtidos embriões de maior tamanho e estádios de desenvolvimento mais avançados. Não houve conversão dos embriões somáticos a plântulas em nenhum dos tratamentos testados. A partir de análises histológicas, foi possível verificar que os embriões somáticos formados em meio contendo 2,4-D por longos períodos apresentaram anormalidades morfológicas (tecido de cicatrização). Esse tecido não foi visualizado em embriões formados após indução por 7 ou 15 dias em meio contendo 2,4-D, indicando os efeitos deletérios deste fitorregulador. Sugere-se a eliminação desse regulador assim que as respostas embriogênicas sejam iniciadas. Sendo assim, no presente trabalho foi desenvolvido pela primeira vez um protocolo de embriogênese somática para jabuticabeira.

Palavras-chave: Ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Embriões somáticos. Glutamina. Massas pró-embriogênicas. PEG 6000.

CHAPTER 2
SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM MATURE SEEDS OF JABUTICABEIRA
(*Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS)

ABSTRACT

Jaboticaba (*Plinia peruviana*) is a Myrtaceae tree native to Brazil. The taste and medicinal properties of its fruits, including anti-inflammatory and anti-diabetic activities, give to this species great economic importance. Among the vegetative propagation techniques, somatic embryogenesis may be an alternative to obtain uniform plants in a short period of time. The aim of this study was to obtain a somatic embryogenesis protocol of Jaboticaba and to verify somatic embryos morphology by using histological analysis. Fruits of jaboticaba were de-coated and seeds were cut in half before *in vitro* introduction. For the induction of embryogenic cultures, we tested different culture media (MS and LPM), nitrogen sources (glutamine and hydrolyzed casein), glutamine concentrations (250, 500, 750 or 1000 mg.L⁻¹), different 2,4-D concentrations (2.5; 5; 10; 25 or 50 µM), exposure times to 2,4-D (7, 15, 30, 45 or 60 days), combinations of auxin and BAP and, finally, use of polyvinylpyrrolidone (PVP) in different concentrations (250, 500, 750 or 1000 mg.L⁻¹). For somatic embryos maturation, different compounds (sucrose, maltose, sorbitol, polyethylene glycol 6000 and activated charcoal), various concentrations of polyethylene glycol 6000 (30, 60 or 90 g.L⁻¹) or abscisic acid (0.1; 0.5; 1.5; 10 or 50 µM) were tested. For embryo conversion, various concentrations of GA₃ (1.44; 2.88 or 5.77 µM) were compared in combination or not with 0.5 µM of BAP. After 60 days, the best treatment for the induction of proembryogenic masses (PEMs) was the MS medium, with the addition of 1000 mg.L⁻¹ glutamine and 10 µM 2,4-D, without BAP. This cytokinin was inhibitory to the PEMs formation. There was no difference between the periods of exposure to 2,4-D in PEM induction percentage. In addition, PVP reduced the oxidation of cultures, but did not result in a higher percentage of PEMs or somatic embryos. After 30 days of maturation, embryos with larger size and more advanced stages of development were obtained in media containing 60 g.L⁻¹ PEG 6000. There was no conversion of somatic embryos to seedlings in any treatment tested. By using histological analysis, it was possible to verify that somatic embryos formed in medium containing 2,4-D for long exposure periods showed morphological abnormalities (cicatrização tissue). This tissue was not visualized in embryos formed after 7 or 15 days in 2,4-D, indicating the deleterious effect of this plant regulator. Elimination of this auxin is suggested as soon as the embryogenic responses are initiated. A protocol for the somatic embryogenesis of jaboticaba was developed for the first time.

Keywords: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. Glutamine. PEG 6000. Proembryogenic masses. Somatic embryos.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de jabuticabeira pertencentes ao gênero *Plinia*, a jabuticabeira-de-cabinho (*P. peruviana*) é uma árvore nativa que apresenta distribuição restrita às regiões Sudeste e Sul do Brasil (SOARES-SILVA, 2000; SOBRAL et al., 2015). Seus frutos saborosos são ricos em compostos que lhe conferem várias propriedades medicinais, como efeito antioxidante, anti-inflamatório e cardioprotetor (SOUZA-MOREIRA et al., 2008; ABE et al., 2012; WU et al., 2012, 2013; BORGES et al., 2014).

A maior parte da produção de jabuticaba é proveniente de pequenas propriedades (LANDRUM, 1986; ALMEIDA-TEIXEIRA et al., 2011; DUARTE; PAULL, 2015) e sua principal forma de propagação se dá por meio de sementes (PEREIRA et al., 2005; CASSOL et al., 2015). A perda de viabilidade causada pelo armazenamento das sementes recalcitrantes, contudo, limita sua propagação em maior escala (VALIO; FERREIRA, 1992; DANNER et al., 2011; DUARTE; PAULL, 2015).

A baixa porcentagem de enraizamento de estacas (até 40%) restringe a produção de mudas por meio dessa técnica (PEREIRA et al., 2005). Os alporques apresentam taxa de enraizamento de até 100%, porém os resultados são bastante variáveis conforme a época do ano e não foram realizados estudos com as mudas em condições de campo (DANNER et al., 2006; CASSOL et al., 2015). A enxertia é atualmente o método mais eficaz de produção de mudas de jabuticabeira, mas não houve a avaliação em longo prazo das mudas produzidas (SASSO et al., 2010; DUARTE; PAULL, 2015). O estabelecimento de métodos de propagação clonal da espécie se faz necessário para a obtenção de um grande número de mudas, especialmente no caso de genótipos superiores (CASSOL et al., 2015).

A embriogênese somática pode ser utilizada com uma alternativa para a propagação em larga escala de espécies recalcitrantes a outros métodos de propagação convencionais (MERKLE; DEAN, 2000; VON ARNOLD et al., 2002; GIRI et al., 2004), podendo ser aplicada, teoricamente, a qualquer espécie vegetal (VON ARNOLD et al., 2002). Segundo Mitra e Chaturvedi (1972), há uma correlação direta entre o grau de poliembrião e respostas embriogênicas na cultura *in vitro*. Assim, o processo de embriogênese somática pode ser facilitado em jabuticabeira, visto que a espécie apresenta sementes poliembriônicas (ALEXANDRE et al., 2006; HÖSSEL et al., 2013).

No caso de plantas lenhosas, a indução da embriogênese somática é normalmente mais eficiente a partir do uso de tecidos jovens, como gametófitos e embriões zigóticos (ISAH, 2016). Na maioria das espécies de Myrtaceae, os protocolos de embriogênese somática utilizam esse tipo de explante, como observado para *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996b; DAL VESCO; GUERRA, 2001; GUERRA et al., 2001, 2013; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004, 2007, 2014; FRAGA et al., 2012), *Psidium guajava* (RAI et al., 2007; AKHTAR, 2010, 2013; BAJPAI et al., 2016), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999) e *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007). Segundo Fehér (2005), existe um gradiente de resposta entre os vários órgãos da planta e o potencial embriogênico é maior em tecidos de origem embrionária.

Análises histológicas podem ser utilizadas em conjunto com a cultura *in vitro* para caracterização de eventos morfológicos e identificação da origem dos órgãos formados (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992; ROCHA et al., 2016). No caso da embriogênese somática, estas análises são importantes para caracterizar a morfologia normal ou anormal dos embriões obtidos, bem como sua origem uni ou multicelular (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992). Ademais, as análises histológicas podem revelar anormalidades nas estruturas obtidas na cultura de tecidos (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992), como a formação de embriões somáticos incapazes de converter em plântulas (CANHOTO; CRUZ, 1996b; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004; PESCADOR et al., 2008). Finalmente, essas análises constituem ferramentas importantes para otimizar os protocolos desenvolvidos (CORREDOIRA et al., 2006).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de embriogênese somática a partir de explantes obtidos de sementes maduras de jabuticabeira de cabinho (*Plinia peruviana*). Além disso, foram avaliados os aspectos histológicos de embriões somáticos de jabuticabeira, de maneira a caracterizar as massas pró-embriogênicas obtidas na cultura *in vitro* e identificar possíveis anormalidades que dificultem ou impeçam o desenvolvimento normal dos embriões somáticos formados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos de embriogênese somática foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal, enquanto as análises histológicas foram conduzidas no Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal, ambos localizados no Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná.

2.2 MATERIAL VEGETAL E DESINFESTAÇÃO

Frutos de jaboticabeira (FIGURA 1A) foram adquiridos no Mercado Municipal de Curitiba (PR) e despolidos manualmente. Em um mesmo fruto, foi possível obter de uma a três sementes. O tamanho das sementes foi bastante variável.

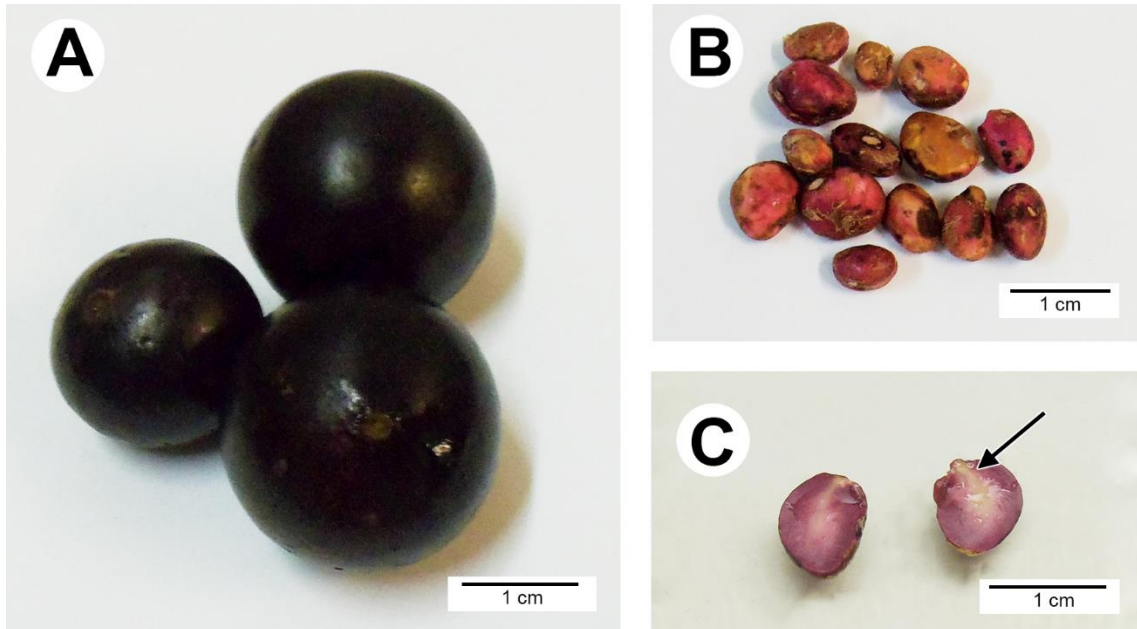
A mucilagem aderida às sementes foi removida (FIGURA 1B) com o auxílio de uma espátula de metal. Quando necessário, as sementes foram armazenadas em sacos de papel sob refrigeração (4°C) por até 24 horas antes da introdução *in vitro*.

As sementes foram submetidas à desinfestação em câmara de fluxo laminar com etanol 70% por 1 minuto (FIGURA 1C), seguido de hipoclorito de sódio 5%, acrescido de 0,01% de Tween-20®, por 10 minutos. Em seguida, foram enxaguadas no mínimo três vezes em água destilada autoclavada, permanecendo em solução a 1% de polivinilpirrolidona (PVP) até sua inoculação *in vitro*.

As sementes foram seccionadas longitudinalmente e os cotilédones foram separados, mantendo-se o eixo embrionário (FIGURA 1C). Os eixos embrionários não foram destacados da semente, uma vez que estavam firmemente aderidos a ela. No caso das sementes poliembriônicas, apenas o embrião zigótico foi utilizado. Este apresentava maior tamanho em relação aos embriões de origem apomítica. Os embriões apomíticos foram descartados devido à alta oxidação e não foram introduzidos *in vitro*.

Os explantes utilizados, portanto, foram definidos como sementes maduras divididas ao meio. Cada explante, contendo um cotilédone e um embrião resultado da fecundação, foi introduzido individualmente em tubo de ensaio com 15 cm de altura e 2,5 de diâmetro, contendo 10 mL de meio de cultura.

FIGURA 1 – PROCESSO DE DESINFESTAÇÃO E INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*). A - FRUTOS DE JABUTICABEIRA; B - SEMENTES DE JABUTICABEIRA, APÓS A REMOÇÃO DA MUCILAGEM; C - EXPLANTES (COTILÉDONES COM O EIXO EMBRIONÁRIO (SETA)).



FONTE: O autor (2017)

2.3 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura base (MB) consistiu em sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar (Vetec®). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

2.4 INICIAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS APÓS PERÍODO PROLONGADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 2,4-D

2.4.1 Experimentos de indução

Após a desinfestação, os explantes foram introduzidos individualmente em tubos de ensaio (15 cm de altura e 2,5 de diâmetro) contendo 10 mL de meio de cultura “MB”. Os experimentos foram realizados conforme a Tabela 1, que lista as fontes de variação testadas e o número de repetições por tratamento. Em todos os experimentos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada

unidade experimental consistiu em quatro tubos de ensaio contendo um explante cada.

TABELA 1 – EXPERIMENTOS DE INDUÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS (MPE) DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), FONTES DE VARIAÇÃO TESTADAS E NÚMERO DE REPETIÇÕES

EXPERIMENTO DE INDUÇÃO DE MPE	FONTES DE VARIAÇÃO	NÚMERO DE REPETIÇÕES
Composições de sais e vitaminas do meio de cultura	Meio MS ou LPm (VON ARNOLD; ERIKSSON, 1981); Vitaminas MS ou Morel e Wetmore (1951)	6
Fontes de nitrogênio e concentrações de 2,4-D	1 g.L ⁻¹ de glutamina, caseína hidrolisada (+ tratamento controle); 10 ou 20 µM de 2,4-D	5
Fontes de nitrogênio e concentrações de 2,4-D, na presença de 1 g.L ⁻¹ de carvão ativado	1 g.L ⁻¹ de glutamina, caseína hidrolisada, combinação de ambos (+ tratamento controle); 50 ou 100 µM de 2,4-D	10
Concentrações de glutamina	0, 250, 500, 750 ou 1000 mg.L ⁻¹ de L-glutamina	10
Concentrações de 2,4-D	2,5; 5; 10; 25 ou 50 µM de 2,4-D	10
Combinações de BAP e 2,4-D	5, 10 ou 20 µM de 2,4-D; 0; 2,5 ou 5 µM de BAP	10
Concentrações de PVP	0, 250, 500, 750 ou 1000 mg.L ⁻¹ de polivinilpirrolidona	10

Após 30 dias de cultura, os explantes foram transferidos para meio de cultura fresco idêntico. Após 60 dias da inoculação, foram avaliados a porcentagem de formação de calos, porcentagem de massas pró-embriogênicas (MPEs), porcentagem de formação de embriões somáticos (ES), explantes contendo raízes (ER) e eixos embrionários germinados (EG).

2.4.2 Manutenção e proliferação das massas pró-embriogênicas

As MPEs utilizadas para maturação foram obtidas a partir do melhor tratamento do experimento contendo diferentes concentrações de 2,4-D e adição de fontes de nitrogênio (combinação de 10 µM de 2,4-D e 1 g.L⁻¹ de glutamina).

Após um período de indução de 60 dias em MB contendo 10 µM de 2,4-D e 1 g.L⁻¹ de glutamina, as MPEs foram transferidas para MB contendo 5 µM de 2,4-D. Repicagens para meio idêntico foram realizados a cada mês.

2.4.3 Maturação das culturas

Massas pró-embriogênicas obtidas da fase de proliferação foram utilizadas para os experimentos de maturação, sendo transferidas para MB sem reguladores a fim de que os ES aumentassem de tamanho e pudessem ser individualizados. Após 60 dias, embriões somáticos em estágio globular ou cordiforme, medindo de 1 a 1,5 mm foram utilizados para os experimentos na fase de maturação. Estes embriões foram transferidos para MB suplementado com diferentes aditivos (TABELA 2). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para cada um dos tratamentos, foram utilizadas dez repetições. Cada unidade experimental consistiu em um frasco de vidro (9 cm de altura por 6,5 cm de diâmetro) contendo 40 mL de meio de cultura, com cinco embriões somáticos em cada.

TABELA 2 – EXPERIMENTOS DE MATURAÇÃO DAS CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) E FONTES DE VARIAÇÃO TESTADAS

EXPERIMENTO DE MATURAÇÃO	FONTES DE VARIAÇÃO
Diferentes compostos	30 (controle) ou 60 g.L ⁻¹ de sacarose, 30 ou 60 g.L ⁻¹ de maltose, sacarose em combinação com maltose (30 g.L ⁻¹ cada), 60 g.L ⁻¹ de sorbitol, 30 ou 60 g.L ⁻¹ de polietilenoglicol 6000; 0,5 ou 1 g.L ⁻¹ de carvão ativado
Concentrações de PEG 6000	30, 60 ou 90 g.L ⁻¹ de polietilenoglicol 6000
Concentrações de ABA	0,1; 0,5; 1; 5; 10 ou 50 µM de ácido abscísico

Após 30 dias em meio de maturação, foram avaliadas as porcentagens de ES que permaneceram em estágio globular e de ES maduros (cordiforme, torpedo e cotiledonar), embriões maiores que 2 mm e embriões maiores que 5 mm.

2.4.4 Conversão dos embriões somáticos

Embriões somáticos maiores do que 2 mm, obtidos de tratamento com 60 g.L⁻¹ de PEG 6000, foram transferidos para frascos contendo 40 mL de MB. O meio foi acrescido de ácido giberélico (GA₃) em diferentes concentrações (0; 1,44; 2,88 ou 5,77 µM), na presença ou não de 0,5 µM de BAP.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um arranjo bifatorial. Para cada um dos oito tratamentos, foram utilizadas dez repetições. Cada

unidade experimental consistiu em um frasco de vidro contendo cinco embriões somáticos.

Após 30 dias em sala de crescimento, foi observada a taxa de conversão dos embriões somáticos.

2.5 INICIAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS EM VÁRIOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO 2,4-D

2.5.1 Indução de massas pró-embriogênicas em diferentes tempos de exposição ao 2,4-D

Após a desinfestação das sementes, os explantes foram introduzidos individualmente em meio MB contendo 1 g.L^{-1} de GLUT e $10 \text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D, sendo transferidas para meio sem adição de reguladores após 7, 15, 30, 45 ou 60 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para cada tratamento, foram utilizadas dez repetições, consistindo de quatro tubos de ensaio contendo um explante cada.

Após um mês de cultura, os explantes de todos os tratamentos foram transferidos para meio fresco. Após 60 dias, foram avaliados a porcentagem de formação de calos, porcentagem de MPEs, porcentagem de formação de ES, de explantes contendo raízes e eixos embrionários germinados.

2.5.2 Manutenção e proliferação das massas pró-embriogênicas

As massas pró-embriogênicas obtidas em tratamento por tempo reduzido de exposição ao 2,4-D (7 ou 15 dias) foram mantidas em MB sem reguladores, sendo subcultivadas para o mesmo meio a cada 30 dias.

2.6 CONDIÇÕES DE CULTURA

Os explantes utilizados em todos os experimentos de embriogênese somática foram mantidos em sala de crescimento no escuro, a 20°C de noite e $26 \pm 1^\circ\text{C}$ de dia. Para a conversão, os embriões somáticos foram transferidos para a luz (fotoperíodo

de 16h), sob luz branca fluorescente com DFFF (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) de aproximadamente $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram repetidos uma vez, exceto os testes de indução com diferentes fontes de nitrogênio (item 3.1.1.2) e concentrações de 2,4-D (item 3.1.1.4), que foram repetidos duas vezes. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para avaliação da homogeneidade e, em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida pela comparação de médias a partir do Teste SNK a 5% de probabilidade. O software estatístico utilizado para as análises foi o Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016).

2.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Embriões somáticos em estágio globular, cordiforme e torpedo foram coletados para a realização das análises histológicas. Estes ES foram obtidos a partir de tratamento prolongado em 2,4-D (indução por 60 dias em meio de cultura contendo $10 \mu\text{M}$ da auxina e proliferação de MPE por seis meses em $5 \mu\text{M}$ do fitorregulador). Além disso, foram coletados ES obtidos em fase de indução por 7 a 15 dias em meio de cultura contendo 2,4-D e posteriormente transferidos para meio de cultura em meio de cultura sem reguladores por dois meses.

As massas pró-embriogênicas e embriões somáticos em vários estágios de desenvolvimento foram coletados e fixados em solução de Karnovsky (1965). As amostras foram desidratadas em série etanólica e foram armazenadas em etanol 70%. As amostras foram infiltradas em resina de metacrilato (Technovit-7100) e, posteriormente, seccionadas com espessura de $5 \mu\text{m}$ em micrótomo rotativo (Olympus CUT 4055) e tratadas com azul de toluidina 0,12% em bórax 5%. As lâminas foram montadas com água e visualizadas em microscópio (Olympus EX41) com câmera acoplada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 INICIAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS APÓS PERÍODO PROLONGADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 2,4-D

3.1.1 Indução de massas pró-embriogênicas

Em menos de 30 dias de cultura, houve a formação de calos a partir de sementes maduras de jabuticabeira. No entanto, nem todos os calos apresentaram capacidade embriogênica. As massas pró-embriogênicas exibiam aspecto friável, de coloração amarelada ou marrom clara (FIGURA 2A), enquanto as estruturas não embriogênicas possuíam aparência compacta, de coloração mais escura, sendo muitas vezes acompanhadas de raízes (FIGURA 2B).

Depois de três a quatro semanas da inoculação, os primeiros ES em estágio globular foram observados. O período de tempo para a formação de embriões foi semelhante ao reportado para embriões zigóticos de *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999) e *Psidium guajava* (AKHTAR, 2010). Na maioria dos casos, os ES de jabuticabeira foram observados a partir de calos previamente formados na superfície dos explantes. Estas massas pró-embriogênicas originaram-se principalmente na região do eixo embrionário das sementes. A predominância da embriogênese indireta também foi relatada para *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990).

A formação de ES ocorreu de forma assincrônica, assim como para outras espécies de Myrtaceae, como *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999), *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007) e *Psidium guajava* (AKHTAR, 2010, 2013). Deste modo, em um mesmo explante, os ES obtidos apresentavam-se em diferentes estádios de desenvolvimento, principalmente globular e cordiforme.

Devido ao tamanho reduzido e grande quantidade, o número de ES por massa pró-embriogênica (intensidade da embriogênese) não foi avaliado. Em alguns explantes foram obtidos poucos embriões (1 ou 2), enquanto em algumas culturas esse número ultrapassou 200 ES por explante. Resultado semelhante foi observado para *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999) e *Psidium guajava* (AKHTAR, 2010, 2013). As diferenças nas respostas observadas durante a cultura de tecidos frequentemente resultam de diferenças genéticas

(HENRY et al., 1994) e, em muitos casos, a indução de embriogênese somática está associada com o genótipo da planta-mãe (CANHOTO; CRUZ, 1996a; GUERRA et al., 2001). No caso de espécies não domesticadas, como a jabuticabeira, não existe a caracterização de germoplasma ou genótipos elite (CITADIN et al., 2010). Além disso, a variabilidade genética natural devido ao uso de sementes como explantes pode explicar a grande variação em relação ao número de embriões somáticos formados por MPE.

3.1.1.1 Efeito de diferentes composições de sais e vitaminas do meio de cultura

Após 60 dias de cultura, a taxa de formação de calos foi estatisticamente semelhante em todos os tratamentos avaliados, com uma média geral de 57,8%. As porcentagens médias de formação de MPE (20,7%) e raízes (16,7%) não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (TABELA 3; ANEXOS 3.5-3.7).

TABELA 3 – FORMAÇÃO DE CALOS, MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS (MPE) E MASSAS CONTENDO EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES) EM CULTURAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), CONFORME MEIO DE CULTURA E VITAMINAS, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

MEIO DE CULTURA	% CALOS		% MPE		% ES	
	VITAMINAS		VITAMINAS		VITAMINAS	
	MS	M&W	MS	M&W	MS	M&W
MS	60,0 ^{ns}	52,8 ^{ns}	25,7 ^{ns}	21,4 ^{ns}	17,1 aA	7,1 aB
LPm	55,7 ^{ns}	62,8 ^{ns}	17,1 ^{ns}	18,5 ^{ns}	0,0 bA	8,5 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna, e letra maiúscula em uma mesma linha não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo; M&W – Morel e Wetmore. Média de dois ensaios independentes.

Houve interação entre os fatores testados para a porcentagem de massas contendo ES. A porcentagem de MPEs contendo embriões somáticos foi maior em meio de cultura MS, com as vitaminas do MS, em relação aos demais tratamentos (TABELA 3). O crescimento e a morfogênese dos tecidos podem variar entre diferentes espécies vegetais, de acordo com suas necessidades nutricionais (SAAD; ELSHAHED, 2012). De maneira geral, a composição salina MS é mais concentrada em relação ao meio de cultura LPm (ANEXO 1). A maior concentração de nutrientes do meio de cultura MS poderia explicar os resultados superiores obtidos na indução de embriões somáticos de jabuticabeira. Os sais MS são utilizados para outras

espécies de Myrtaceae, como *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999) e *Psidium guajava* (RAI et al., 2007; AKHTAR, 2010, 2013; BAJPAI et al., 2016). Para *Acca sellowiana*, os primeiros protocolos de embriogênese somática utilizaram o meio de cultura MS (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996a, 1996b), sendo mais tarde substituído pelo meio LPm (DAL VESCO; GUERRA, 2001; GUERRA et al., 2001, 2013; PESCADOR et al., 2013). Segundo Dal Vesco (1998), a formulação salina LPm resulta em maiores taxas de indução em *Acca sellowiana*, quando comparada às obtidas para os meios MS e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980).

Para a jabuticabeira, a maior disponibilidade de vitaminas observada no meio descrito por Morel e Wetmore (1951) não resultou em melhores respostas embriogênicas. Segundo Al-Khayri (2001), a influência das vitaminas na indução e proliferação de calos pode ser bastante variável entre diferentes espécies. No geral, a composição de vitaminas de Morel e Wetmore (1951) se apresenta em maiores concentrações do que no meio MS, além da presença de pantotenato de cálcio e biotina (ANEXO 2). Ao contrário, a glicina aparece na composição do meio MS, porém não na formulação descrita por Morel e Wetmore (1951). Como apontado por Asad et al. (2009), a glicina pode estimular as respostas embriogênicas devido à sua utilização como fonte de nitrogênio orgânico, bem como seu papel na reestruturação de células em divisão, a partir da síntese da parede celular.

3.1.1.2 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e concentrações de 2,4-D

Após 60 dias de cultura, a porcentagem média geral de formação de calos foi de 94,8%, sem diferença estatística entre os tratamentos (TABELA 4; ANEXOS 3.8-3.10). A formação de MPEs não diferiu entre as concentrações de 2,4-D testadas (média de 48,4%). A adição de caseína hidrolisada ao meio de cultura não favoreceu o aparecimento de MPEs ou ES, não diferindo estatisticamente dos resultados obtidos no tratamento controle (FIGURAS 2B E 2C). Por outro lado, na presença de glutamina a porcentagem de formação de MPEs foi aumentada de 43,7% para 64,0%. Em média, 39% das MPEs apresentaram embriões somáticos ao final de 60 dias. Com a adição de glutamina ao meio de cultura, essa porcentagem foi de 57,8% (FIGURAS 2E e 2F).

Em relação à formação de massas contendo ES, houve interação entre os fatores testados (TABELA 4). No caso de meio de cultura contendo 10 μ M de 2,4-D, a presença de glutamina resultou na maior porcentagem de ES (71,8%). A formação

de raízes nos explantes ocorreu no controle (46,8%) e em todos os tratamentos. Em alguns casos, as raízes foram observadas juntamente com as MPE, havendo a formação de ES (FIGURA 2A). Por outro lado, em alguns explantes houve apenas a formação de raízes, sem resposta embriogênica (FIGURA 2B). A porcentagem de raízes foi reduzida para 25,0% na presença de glutamina ou caseína hidrolisada.

TABELA 4 – FORMAÇÃO DE CALOS, MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS (MPE) E MASSAS CONTENDO EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES) EM CULTURAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), CONFORME CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D E FONTE DE NITROGÊNIO ADICIONADA AO MEIO DE CULTURA MS, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

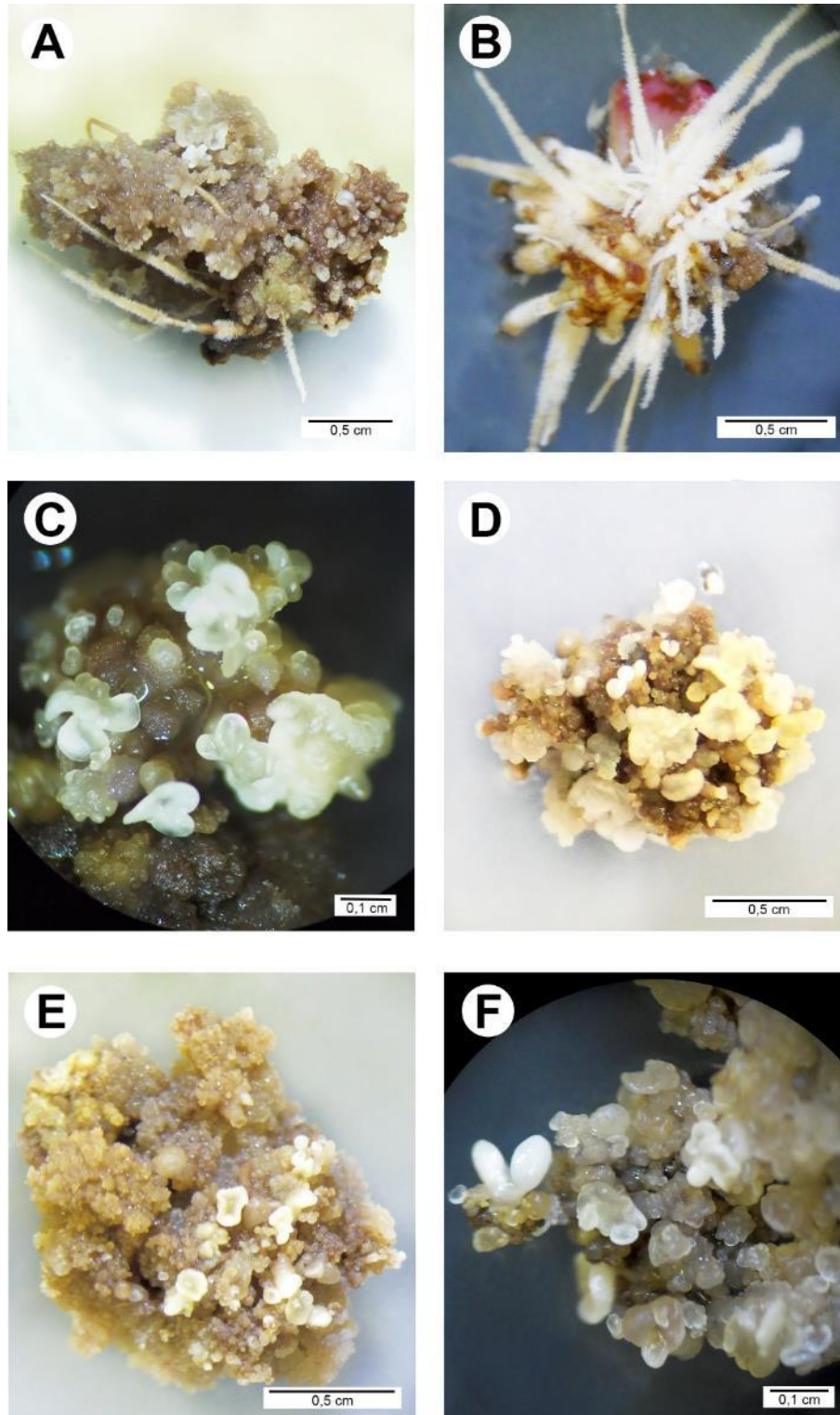
FONTE DE N (1 g.L ⁻¹)	% CALOS			% MPE			% ES		
	10 µM 2,4 D	20 µM 2,4 D	Média	10 µM 2,4 D	20 µM 2,4 D	Média	10 µM 2,4 D	20 µM 2,4 D	Média
-	93,8	93,8	93,8 ^{ns}	43,7	43,7	43,7 ^b	31,2 ^{bA}	31,2 ^{aA}	31,2
CH	93,8	100,0	96,9 ^{ns}	25,0	50,0	37,5 ^b	12,5 ^{bB}	43,7 ^{aA}	28,1
GLUT	96,9	90,6	93,8 ^{ns}	65,6	62,5	64,0 ^a	71,8 ^{aA}	43,7 ^{aB}	57,8
Média	94,7 ^{ns}	94,7 ^{ns}	94,8	44,7 ^{ns}	52,0 ^{ns}	48,4	38,5	39,5	39,0

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna, e letra maiúscula em uma mesma linha não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo; CH – caseína hidrolisada; GLUT – glutamina. Média de três ensaios independentes.

Segundo Higashi et al. (1996), a adição de determinados aminoácidos ao meio de cultura resulta na formação de embriões somáticos devido ao aumento do metabolismo do nitrogênio. Esses compostos orgânicos servem como fontes primárias de nitrogênio na forma reduzida e são benéficos durante a indução e desenvolvimento dos embriões (WETHERELL; DOUGALL, 1976; MERKLE et al., 1995; DAL VESCO; GUERRA, 2001; YANG; ZHANG, 2010). Dentre os aminoácidos utilizados, a alanina e glutamina frequentemente estimulam a embriogênese (WETHERELL; DOUGALL, 1976; NOMURA; KOMAMINE, 1995).

A necessidade de aminoácidos depende da espécie, do explante e da morfologia desejada (DAL VESCO; GUERRA, 2001). Assim, aminoácidos adicionados ao meio podem ser efetivos, neutros ou até mesmo apresentar efeito inibitório sobre as culturas (MERKLE et al., 1995). Como foi observado no presente trabalho, a glutamina também exibiu resultados promissores em culturas de embriões zigóticos de *Acca sellowiana* (DAL VESCO; GUERRA, 2001) e *Psidium guajava* (BAJPAI et al., 2016), com maior número de ES formados por MPE.

FIGURA 2 – INDUÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO MS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E FONTES DE NITROGÊNIO. A - MPE EM MEIO CONTENDO 10 μM DE 2,4-D, APRESENTANDO A FORMAÇÃO DE RAÍZES; B - CALO NÃO-EMBRIOGÊNICO COM RAÍZES, EM MEIO COM 20 μM DE 2,4-D; C - ES EM ESTÁDIO GLOBULAR, EM MEIO COM 10 μM DE 2,4-D E 1 G.L⁻¹ DE CASEÍNA HIDROLISADA; D - MPE EM MEIO CONTENDO 20 μM DE 2,4-D E 1 G.L⁻¹ DE CH; E - MPE EM MEIO DE CULTURA COM 10 μM DE 2,4-D E 1 G.L⁻¹ DE GLUTAMINA; F - ES EM MEIO COM 20 μM DE 2,4-D E 1 G.L⁻¹ DE GLUTAMINA.



FONTE: O autor (2017)

A quantidade de nitrogênio disponível afeta o requerimento de reguladores, incluindo auxinas, necessário para desencadear a morfogênese (EUI e SOH, 1997; GEORGE e DE KLERK, 2008). A formação de raízes está relacionada com a adição de 2,4-D ao meio de cultura e, no caso da jabuticabeira, a presença de formas reduzidas de nitrogênio alterou as respostas morfogênicas, resultando em menor porcentagem de rizogênese. A formação de raízes também ocorre em culturas de células em suspensão de cenoura quando não há a adição de formas reduzidas de nitrogênio (HALPERIN, 1966).

No experimento utilizando maiores concentrações de 2,4-D (50 ou 100 μM), na presença de 1 g.L^{-1} de carvão ativado, não houve diferença estatística entre as concentrações da auxina para nenhuma das variáveis testadas, nem interação entre os fatores avaliados (ANEXO 3.11-3.13). Além disso, a presença de uma fonte de nitrogênio (CH ou GLUT) não resultou em alteração na porcentagem de formação de calos (média de 28%), de MPEs (média de 11,8%) e ES (10,3%).

A porcentagem média de formação de calos, MPEs e MPEs contendo embriões somáticos (28,0; 11,8 e 10,3%, respectivamente) foi menor em relação ao meio sem carvão ativado (94,7; 48,4 e 39%, respectivamente). Os diferentes resultados podem ser decorrentes da alta variabilidade genética, uma vez que sementes foram utilizadas como fontes de explantes, e do lote utilizado em cada um dos experimentos. Além disso, a redução nas médias de formação de MPEs e ES pode ser resultado de uma concentração inadequada de 2,4-D, devido à interferência causada pela presença de carvão ativado no meio de cultura.

O carvão ativado é amplamente utilizado na cultura de tecidos e seu efeito varia conforme a espécie estudada, podendo resultar em efeitos positivos ou adversos no desenvolvimento dos explantes (WEATHERHEAD et al. 1978; EBERT et al., 1993; PAN; VAN STADEN, 1998). Seu efeito benéfico reside em sua capacidade de adsorver substâncias inibitórias do meio de cultura, assim eliminando seus efeitos tóxicos (WEATHERHEAD et al. 1978; AZOIFEFA, 2009). Esse adsorvente apresenta afinidade por uma grande gama de substâncias, incluindo compostos fenólicos, auxinas, citocininas, entre outros (PAN; VAN STADEN, 1998; ZHOU et al., 2010). Porém, a adsorção não seletiva do CA pode resultar em efeitos negativos sobre os explantes cultivados *in vitro* (PAN; VAN STADEN, 1998), podendo reduzir a concentração de 2,4-D disponível para as culturas (EBERT et al., 1993).

No presente trabalho, a suplementação de CA pode ter reduzido as respostas embriogênicas, uma vez que a concentração de auxinas e citocininas é normalmente um fator chave que determina o sucesso das culturas *in vitro* (PAN; VAN STADEN, 1998). É provável que o aumento na concentração de 2,4-D em relação ao experimento anterior não tenha sido suficiente para superar a adsorção deste regulador causada pelo carvão ativado e, conseqüentemente, não foi adequada para estimular a embriogênese somática.

3.1.1.3 Efeito de diferentes concentrações de glutamina

Após 60 dias de cultura, em média 81% dos explantes apresentavam a formação de calos, dos quais 25,5% exibiam aspecto embriogênico. As porcentagens de formação de calos, raízes e de germinação dos eixos embrionários não diferiram estatisticamente entre os tratamentos testados (TABELA 5; ANEXOS 3.14-3.18).

TABELA 5 – FORMAÇÃO DE CALOS, MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS (MPE), MASSAS CONTENDO EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES), EXPLANTES COM RAÍZES (ER) E DE EIXOS EMBRIONÁRIOS GERMINADOS (EG) EM CULTURAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) CONFORME CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA ADICIONADA AO MEIO DE CULTURA MS CONTENDO 10 μM DE 2,4-D, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

GLUT (mg.L ⁻¹)	% CALOS ^{ns}	% MPE	% ES	% ER ^{ns}	% EG ^{ns}
0	82,5	12,5 b	10,0 b	17,5	5,0
250	85,0	25,0 b	10,0 b	30,0	2,5
500	70,0	20,0 b	10,0 b	27,5	5,0
750	77,5	22,5 b	12,5 b	22,5	2,5
1000	90,0	47,5 a	32,5 a	22,5	7,5
Média	81,0	25,5	15,0	24,5	4,5

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. Média de dois ensaios independentes.

A formação de MPE e ES ocorreu na ausência de glutamina (FIGURA 3A) e, portanto, não é diretamente dependente da presença deste aminoácido. Em alguns explantes, foi observada a presença de calos de aspecto não embriogênico (FIGURA 3B), de coloração escurecida e aparência compacta. Também foi observada a formação de raízes e, em alguns casos, os explantes com raízes não apresentaram

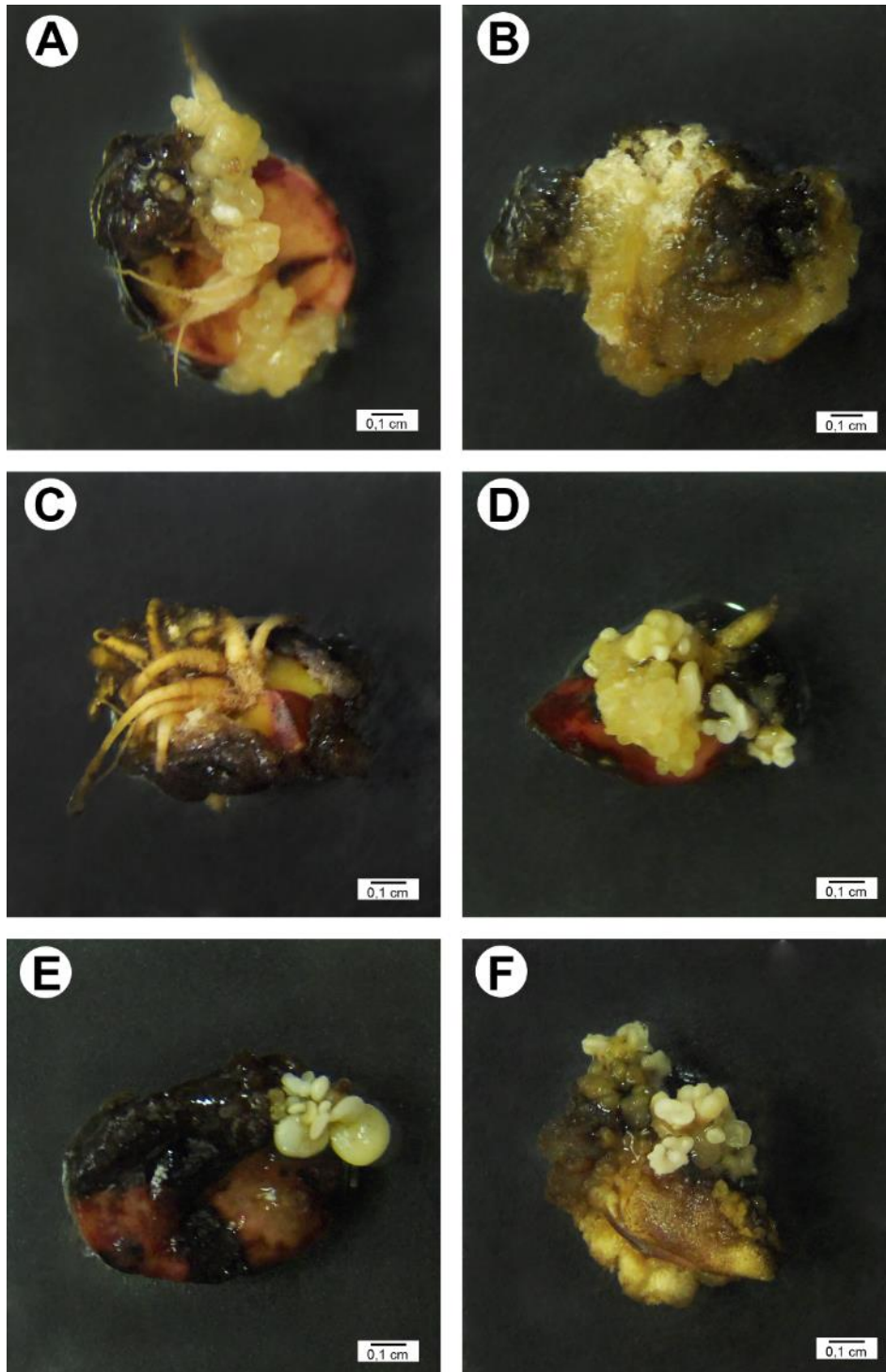
resposta embriogênica (FIGURA 3C). Por outro lado, em alguns casos a formação de raízes e MPEs ocorreu de maneira simultânea (FIGURA 3D).

Embora em quantidades reduzidas, a embriogênese somática direta foi verificada em alguns explantes (FIGURA 3E). Nesses casos, os ES se desenvolveram diretamente a partir da superfície do eixo embrionário presente nas sementes. Na maioria dos casos, a rota embriogênica foi indireta, com a formação de MPEs e, posteriormente, ES (FIGURA 3F).

A adição de 1000 mg.L^{-1} de glutamina ao meio de cultura aumentou a formação de MPEs (47,5%) e massas contendo ES (32,5%) de jabuticabeira (TABELA 5 e FIGURA 3F). Concentrações maiores do que as testadas no presente estudo poderiam estimular ainda mais a formação de ES para essa espécie.

De acordo com Carlsson et al. (2017), o nitrogênio é um nutriente fundamental para a produção eficiente de MPEs, desempenhando papel importante como substrato para respiração e síntese de metabólitos. Fontes de nitrogênio orgânico, particularmente glutamina, manifestam efeitos positivos na embriogênese somática (KHLIFI; TREMBLAY, 1995). A glutamina pode estimular a proliferação e diferenciação dos embriões somáticos (OGITA et al., 2001; PESCADOR et al., 2012; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2014). Embriões somáticos formados na presença desse aminoácido apresentam um aumento de tamanho, além de um sistema vascular mais desenvolvido, em relação àqueles formados em meio de cultura sem adição de glutamina (HIGASHI et al., 1996). Além disso, a alta absorção de glutamina por embriões somáticos nos estádios iniciais de desenvolvimento, particularmente globular e cordiforme, está relacionada ao acúmulo de produtos de reserva que serão posteriormente consumidos durante sua maturação e conversão (PESCADOR et al., 2012; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2014). Assim como no presente trabalho, a glutamina teve efeitos benéficos na indução de ES de *Acca sellowiana* (DAL VESCO; GUERRA, 2001; GUERRA et al., 2013) e *Psidium guajava* (BAJPAI et al., 2016).

FIGURA 3 – INDUÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO MS CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTAMINA. A - EXPLANTE CONTENDO RAÍZES E MPE, EM MEIO SEM GLUTAMINA; B - CALO NÃO EMBRIOGÊNICO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 250 MG.L⁻¹ DE GLUTAMINA; C - RAÍZES FORMADAS EM EXPLANTE MANTIDO EM MEIO ACRESCIDO DE 250 MG.L⁻¹ DE GLUTAMINA; D - MPE E ES FORMADOS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 500 MG.L⁻¹ DE GLUTAMINA; E - EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM EXPLANTE MANTIDO EM TRATAMENTO COM 750 MG.L⁻¹ DE GLUTAMINA; F - MPE E ES EM MEIO COM 1000 MG.L⁻¹ DE GLUTAMINA.



FONTE: O autor (2017)

3.1.1.4 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D

Após 60 dias, 77,5% das culturas apresentaram formação de calos, dos quais apenas 41,5% tinham capacidade embriogênica (TABELA 6; ANEXOS 3.19-3.23). A porcentagem de formação de calos foi maior nos tratamentos contendo concentrações iguais ou superiores a 10 μM de 2,4-D. As maiores porcentagens de formação de MPEs foram obtidas quando os explantes permaneceram em meio de cultura contendo 5, 10, 25 ou 50 μM de 2,4-D. Para a formação de massas contendo ES, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Além disso, conforme a concentração de 2,4-D foi aumentada, foi observada menor porcentagem de germinação dos eixos embrionários presentes nos explantes.

TABELA 6 – FORMAÇÃO DE CALOS, MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS (MPE), MASSAS CONTENDO EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES), EXPLANTES CONTENDO RAÍZES (ER) E EIXOS EMBRIONÁRIOS GERMINADOS (EG) EM CULTURAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), CONFORME CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D ADICIONADA AO MEIO DE CULTURA MS, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

2,4-D (μM)	% CALOS	% MPE	% ES ^{ns}	% ER	% EG
2,5	52,5 c	17,5 b	15,0	50,0 a	37,5 a
5	67,5 bc	32,5 ab	20,0	60,0 a	22,5 ab
10	82,5 ab	60,0 a	37,5	55,0 a	15,0 bc
25	87,5 ab	52,5 a	27,5	37,5 ab	0,0 c
50	97,5 a	45,0 a	20,0	25,0 b	0,0 c
Média	77,5	41,5	24,0	45,5	15,0

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. Média de três ensaios independentes.

O 2,4-D é uma auxina sintética utilizada para iniciação de culturas embriogênicas em várias espécies (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006; ISAH, 2016). O efeito desse regulador e herbicida também está relacionado a modificações epigenéticas (DE-LA-PEÑA et al., 2015; GUAN et al., 2016; KUMAR, VAN STADEN, 2017). Essas variações incluem, principalmente, o remodelamento da cromatina (ISAH, 2016; KUMAR; VAN STADEN, 2017), modificações nas histonas (ISAH, 2016) e um aumento nos níveis de metilação do DNA (LOSCHIAVO et al., 1989; JOSHI; KUMAR, 2013).

A metilação do DNA é acompanhada de sinais que levam as células a se dividir e diferenciar (LOSCHIAVO et al., 1989), processos essenciais para que a embriogênese somática ocorra (DE-LA-PEÑA et al., 2015). Além disso, o remodelamento da cromatina permite que fatores de transcrição e proteínas tenham acesso às regiões promotoras dos genes, controlando a expressão gênica necessária para a aquisição de competência embriogênica pelas células (BAJPAI et al., 2016; KUMAR; VAN STADEN, 2017). Contudo, o aumento nos níveis de metilação do DNA não é exclusivamente dependente das auxinas, mas também pode ser induzido por condições de estresse (FRAGA et al., 2012).

Em testes preliminares, explantes de jabuticabeira introduzidos em meio de cultura sem 2,4-D não formaram calos ou ES, resultando apenas na germinação dos eixos embrionários. No presente experimento, o tratamento controle e as menores concentrações de 2,4-D testadas para jabuticabeira (especialmente 2,5 μM) resultaram na germinação dos eixos embrionários presentes nos explantes. A mesma dependência de auxinas para a indução de embriogênese somática foi observada para embriões zigóticos de *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; FRAGA et al., 2012; GUERRA et al., 2013), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999) e *Psidium guajava* (AKHTAR, 2013). A germinação na ausência ou na presença de baixas concentrações de 2,4-D também foi relatada em culturas de *P. guajava* (AKHTAR, 2010).

No presente estudo, o uso de concentrações iguais ou superiores a 5 μM resultou em maiores porcentagens de formação de MPEs. Para espécies de Myrtaceae, concentrações de até 5 μM de 2,4-D geralmente são mais eficientes na indução da embriogênese somática a partir de embriões imaturos, como no caso de *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990). A concentração de 10 μM mostrou-se eficiente para a indução de ES a partir de embriões zigóticos imaturos de *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999) e *Psidium guajava* (AKHTAR, 2013; BAJPAI et al., 2016). Por outro lado, a concentração mínima de 20 μM foi necessária para a formação de ES a partir de cotilédones de *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007). Para esta espécie, em média 20% das MPEs produziram ES após 50 dias.

No presente trabalho, à medida que a concentração de 2,4-D foi aumentada a partir de 25 μM , houve uma diminuição na porcentagem de formação de raízes nos explantes. Segundo Puigderrajols et al. (2000), o tipo de resposta morfogênica dos tecidos depende de um balanço hormonal preciso, especialmente de auxinas e citocininas. A rizogênese também foi observada em culturas de tecidos de *Oliva*

europaea em meios contendo baixas concentrações de auxina (ORINOS; MITRAKOS, 1991). Um dos efeitos mais conhecidos das auxinas é a formação de raízes laterais e adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2009).

3.1.1.5 Efeito de diferentes combinações de BAP e 2,4-D

Após 60 dias, em média 90% dos explantes apresentaram formação de calos (dados não mostrados), dos quais 54,4% exibiam características embriogênicas (TABELA 7; FIGURA 4A). Não houve interação entre os fatores testados para nenhuma das variáveis analisadas (TABELA 7; ANEXOS 3.24 e 3.25). As porcentagens de MPEs e de ES foram maiores com o uso de 10 ou 20 μM de 2,4-D. De maneira geral, menores concentrações de 2,4-D resultaram em maior porcentagem de eixos embrionários germinados (dados não mostrados). Além disso, concentrações maiores de 2,4-D inibiram a formação de raízes, como no experimento anterior. A partir desse resultado, pode-se sugerir que a concentração de 10 μM de 2,4-D é a mais indicada para a iniciação de culturas embriogênicas de jabuticabeira. Não foi observada germinação dos eixos embrionários em meio contendo 20 μM de 2,4-D.

TABELA 7 – FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS (MPE) E MASSAS CONTENDO EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES) EM CULTURAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), CONFORME CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D E DE BAP ADICIONADOS AO MEIO DE CULTURA MS, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

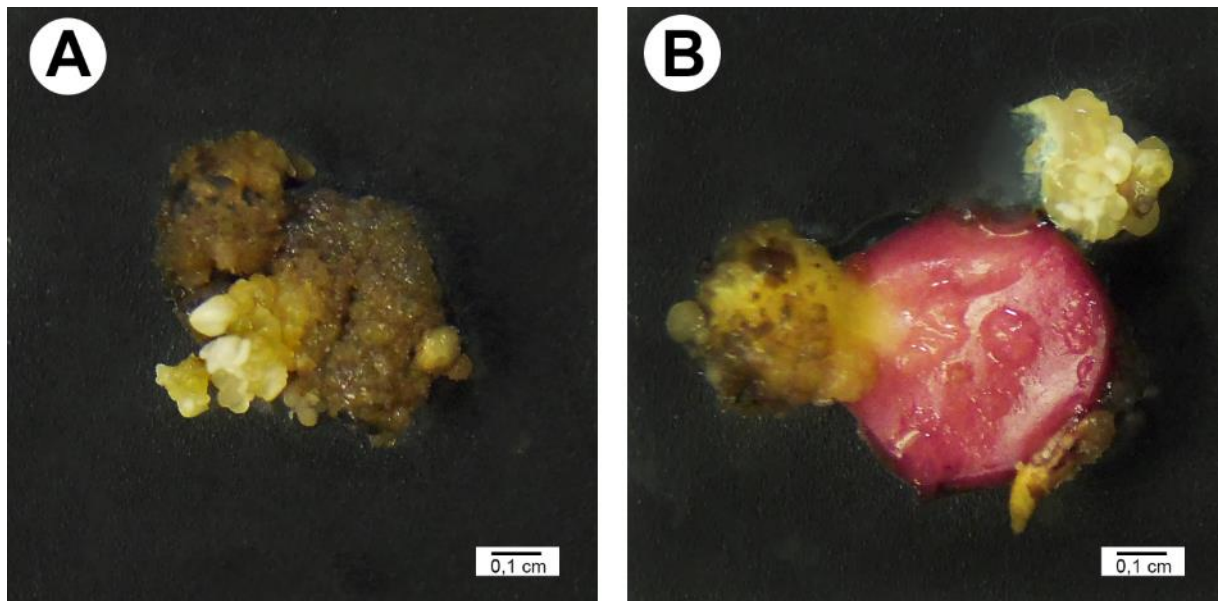
BAP (μM)	% MPE				% ES			
	5 μM 2,4 D	10 μM 2,4 D	20 μM 2,4 D	Média	5 μM 2,4 D	10 μM 2,4 D	20 μM 2,4 D	Média
-	60,0	75,0	65,0	66,6 a	25,0	45,0	57,5	42,5 a
2,5	37,5	65,0	52,5	51,6 b	22,5	40,0	37,5	33,3 ab
5	35,0	52,5	47,5	45,0 b	20,0	30,0	32,5	27,5 b
Média	44,1 b	64,1 a	55,0 ab	54,4	22,5 b	38,3 a	42,5 a	34,4

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. Média de dois ensaios independentes.

A adição de BAP ao meio de cultura reduziu a porcentagem de MPEs e ES formados nas culturas de jabuticabeira (FIGURA 4B), com maiores porcentagens obtidas no tratamento controle. Segundo Gutiérrez-Mora et al. (2012), a participação de outros reguladores, além de auxinas, é importante para o balanço hormonal

necessário para a embriogênese somática. Quando embriões zigóticos maduros são utilizados como explantes, o uso de uma citocinina em combinação com uma auxina pode ser necessário para induzir a formação de embriões somáticos (MERKLE et al., 1995).

FIGURA 4 – FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS E EMBRIÕES SOMÁTICOS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO MS CONTENDO DIFERENTES COMBINAÇÕES DE 2,4-D E BAP. A - EXPLANTE EM TRATAMENTO COM 5 μ M DE 2,4-D; B - EXPLANTE CONTENDO CALO NÃO EMBRIOGÊNICO, MPE E ES EM MEIO COM 20 μ M DE 2,4-D E 2,5 μ M DE BAP.



FONTE: O autor (2017)

Citocininas são importantes na divisão celular e podem ser utilizadas durante a embriogênese somática para estimular a proliferação das células (GUTIÉRREZ-MORA et al., 2012). O 2,4-D é utilizado isoladamente para a indução de embriões somáticos na maioria das espécies de Myrtaceae, como *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1994; DAL VESCO; GUERRA, 2001; GUERRA et al., 2001; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004), *Psidium guajava* (RAI et al., 2007; AKHTAR, 2010; BAJPAI et al., 2016), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999), *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007). Por outro lado, o 2,4-D sozinho não resultou na formação de calos embriogênicos da cultivar Paluma de *Psidium guajava*, sendo necessária a suplementação com a citocinina 2-iP (MOURA; MOTOIKE, 2009).

3.1.1.6 Efeito de diferentes concentrações de polivinilpirrolidona

Após 60 dias de cultura, a oxidação dos explantes foi reduzida de 55% (FIGURA 5A) para 22,5% com o uso de 1 g.L⁻¹ de PVP (FIGURA 5B). Porém, não houve diferença estatística para a porcentagem de calos, MPEs, MPEs contendo ES, de explantes contendo raízes e eixos embrionários germinados entre os tratamentos testados (TABELA 8; ANEXOS 3.26-3.31).

TABELA 8 – FORMAÇÃO DE CALOS, MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS (MPE), MASSAS CONTENDO EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES), EXPLANTES CONTENDO RAÍZES (ER), EIXOS EMBRIONÁRIOS GERMINADOS (EG) E EXPLANTES OXIDADOS (OXID) EM CULTURA DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), CONFORME CONCENTRAÇÃO DE POLIVINILPIRROLIDONA ADICIONADA AO MEIO DE CULTURA MS CONTENDO 10 µM DE 2,4-D, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

PVP (mg.L ⁻¹)	% CALOS ^{ns}	% MPE ^{ns}	% ES ^{ns}	% ER ^{ns}	% EG ^{ns}	% OXID
0	65,0	37,5	30,0	45,0	17,5	55,0 a
250	72,5	22,5	17,5	57,5	7,5	35,0 ab
500	70,0	50,0	37,5	52,5	20,0	30,0 ab
750	70,0	32,5	30,0	70,0	12,5	30,0 ab
1000	67,5	32,5	25,0	65,0	10,0	22,5 b
Média	69,0	35,0	28,0	58,0	13,5	34,5

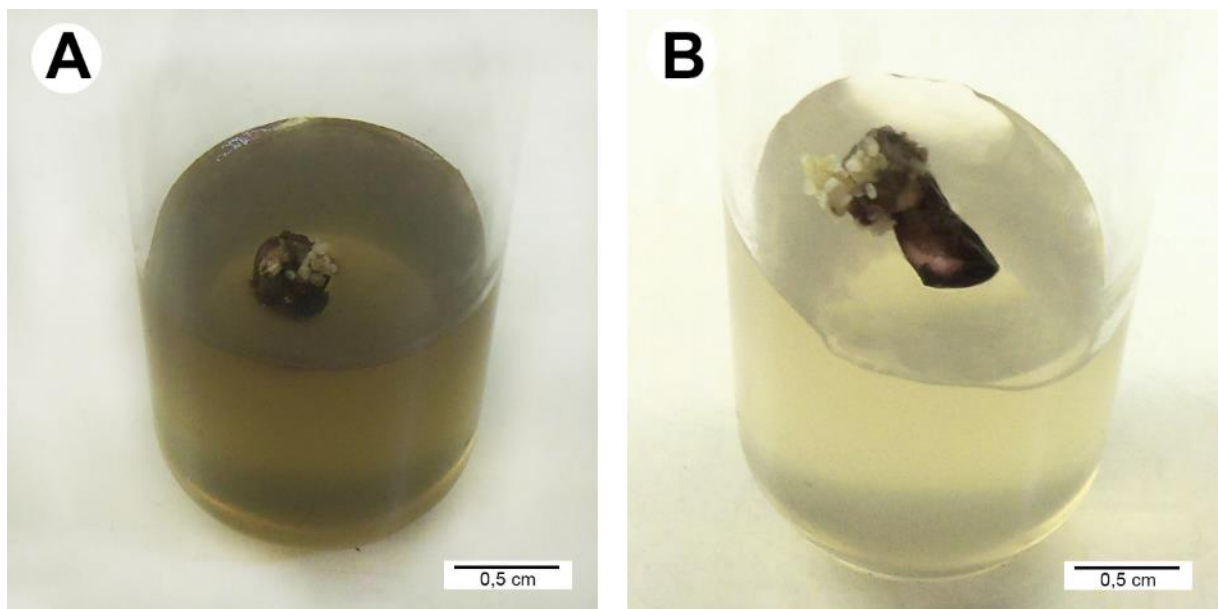
Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. Média de dois ensaios independentes. PVP – Polivinilpirrolidona.

Ao longo do presente trabalho, a maioria das culturas apresentou oxidação, independentemente do tratamento utilizado durante a fase de indução de MPEs (dados não mostrados). Segundo Gallego Rúa et al. (2016), muitas plantas perenes e lenhosas são conhecidas por sua capacidade de produzir metabólitos secundários, notadamente compostos fenólicos. Substâncias fenólicas e outros exsudados na cultura de tecidos reduzem as taxas de estabelecimento, crescimento e desenvolvimento das culturas *in vitro* (KOUASSI et al., 2017). O uso de antioxidantes, como o carvão e a polivinilpirrolidona, pode diminuir os problemas causados pela oxidação de compostos fenólicos no meio de cultura (PAN; VAN STADEN, 1998; KOUASSI et al., 2017).

Para jabuticabeira, por exemplo, a formação de MPEs e ES foi semelhante em todos os tratamentos, mesmo sem o uso de PVP. Embora essa substância tenha apresentado bons resultados na redução da oxidação das culturas, isso não foi

suficiente para estimular e aumentar as respostas embriogênicas, mas também não reduziu a embriogênese somática. Como resultado da adsorção de compostos fenólicos (TYAGI et al., 1981), o PVP também pode exibir ação estimulante na embriogênese somática de algumas espécies (JOHANSSON et al., 1990), como o cacau (KOUASSI et al., 2017). Porém, a indução de embriões somáticos não é incompatível com a produção de compostos fenólicos durante a cultura *in vitro* (REIS et al., 2008).

FIGURA 5 – INDUÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), 30 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO MS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PVP. A - EXPLANTE OXIDADO CONTENDO ES EM MEIO SEM PVP; B - EXPLANTE APRESENTANDO MPE E ES EM MEIO CONTENDO 1 G.L⁻¹ DE PVP.



FONTE: O autor (2017)

Em espécies como o algodão e a goiabeira serrana, os compostos fenólicos produzidos em resposta às condições de estresse da cultura *in vitro* podem criar um ambiente apropriado para a formação e desenvolvimento dos embriões somáticos, provavelmente devido às suas propriedades antioxidantes (KOUAKOU et al., 2007; REIS et al., 2008). Em *Acca sellowiana*, por exemplo, esses compostos fenólicos podem intervir no metabolismo das auxinas, mantendo condições favoráveis para a indução da embriogênese somática (REIS et al., 2008).

Finalmente, deve-se levar em consideração o efeito dos compostos fenólicos na cultura em longo prazo. O desenvolvimento posterior dos embriões somáticos pode ser reduzido ou impedido pela ação inibitória dessas substâncias. Como apontado por

Reis et al. (2008), os compostos fenólicos podem inibir a absorção e transporte de sacarose necessária para o metabolismo dos embriões somáticos e, portanto, os embriões não se desenvolvem a partir do estágio globular.

3.1.2 Manutenção e proliferação das massas pró-embriogênicas

As massas pró-embriogênicas obtidas na etapa de indução mantiveram a capacidade de produzir novos ES por até um ano após a inoculação *in vitro* dos explantes. Nos primeiros seis meses, o número de ES formados a cada 30 dias foi semelhante ao obtido durante a fase de indução (60 dias em meio contendo 10 μM de 2,4-D). Após este período, a formação de ES foi gradualmente reduzida, com escurecimento progressivo das MPEs até o ponto em que se tornaram inteiramente oxidadas e perderam sua capacidade embriogênica. No caso de *Myrtus communis*, a perda do potencial embriogênico dos calos ocorreu após oito semanas de cultura (CANHOTO et al., 1999). Por outro lado, culturas de *Myrciaria aureana* foram mantidas por até dois anos, com subcultivos a cada 30 dias (MOTOIKE et al., 2007).

3.1.3 Maturação das culturas

3.1.3.1 Maturação em diferentes compostos

Durante a etapa de maturação, houve proliferação dos embriões somáticos inoculados nos meios contendo sacarose ou carvão ativado, em ambas as concentrações testadas. Nesses tratamentos, foi observada a embriogênese repetitiva e, a partir de MPEs contendo 10 ES, ocorreu a formação de até 25 ES (FIGURA 6A). A embriogênese repetitiva também foi observada em embriões somáticos de *Psidium guajava* mantidos em meio de cultura sem reguladores (BAJPAI et al., 2016).

Após 30 dias em meios de maturação, a maior parte dos ES de jaboticabeira encontrava-se em estágio cordiforme. Menores quantidades de embriões em fase inicial de desenvolvimento (globular) foram obtidas em meio de cultura contendo 60 g.L^{-1} de PEG 6000 (TABELA 9; ANEXOS 3.32-3.34). As maiores porcentagens de ES maduros (em fase de desenvolvimento cordiforme, torpedado ou cotiledonar) foram observadas em meio de cultura contendo PEG 6000.

Embriões somáticos maiores do que 2 mm foram obtidos em todos os tratamentos, com exceção dos meios contendo sacarose (30 ou 60 g.L⁻¹), com a maior quantidade observada em meio com 60 g.L⁻¹ de PEG 6000.

TABELA 9 – MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) CONFORME COMPOSTO ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA MS, 30 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE MATURAÇÃO

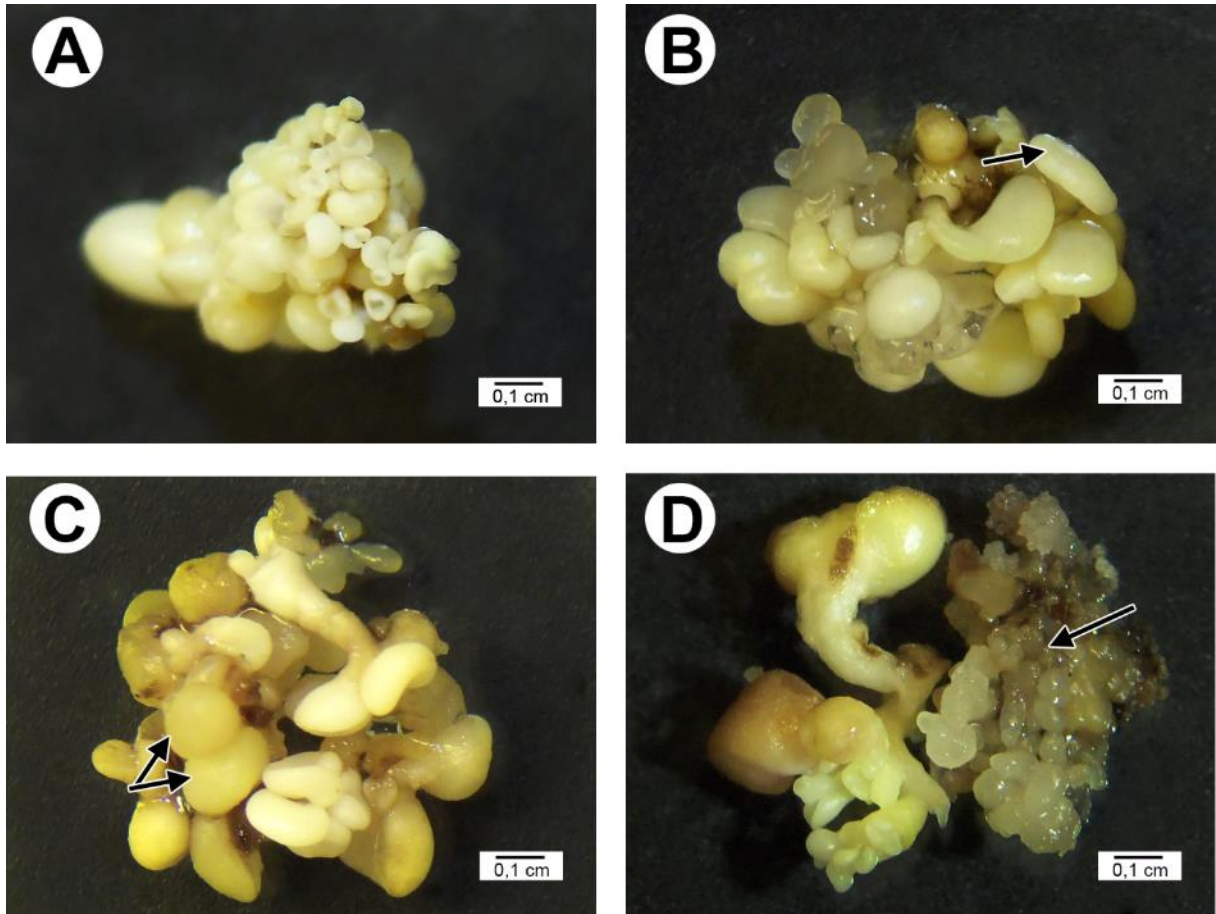
COMPOSTO	PORCENTAGEM DE EMBRIÕES SOMÁTICOS		
	GLOBULAR	MADUROS	TAMANHO >2MM
30 g.L ⁻¹ sacarose	48,4 a	54,6 b	0,0 b
60 g.L ⁻¹ sacarose	43,0 a	57,0 b	0,0 b
30 g.L ⁻¹ maltose	41,6 a	58,4 b	14,0 ab
60 g.L ⁻¹ maltose	32,5 ab	67,5 ab	13,4 ab
30 g.L ⁻¹ sacarose + maltose	34,3 ab	65,7 ab	14,7 ab
60 g.L ⁻¹ sorbitol	16,0 ab	84,0 ab	23,3 ab
30 g.L ⁻¹ PEG 6000	33,0 ab	67,0 ab	29,0 ab
60 g.L ⁻¹ PEG 6000	4,4 b	95,6 a	38,9 a
0,5 g.L ⁻¹ carvão ativado	24,4 ab	75,6 ab	7,0 b
1 g.L ⁻¹ carvão ativado	17,7 ab	82,3 ab	9,5 ab
Média	29,5	70,4	15,0

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. Média de dois ensaios independentes.

Em todos os tratamentos foram observados embriões somáticos de morfologia anormal, incluindo ES sem cotilédones (FIGURA 6B, seta) e fusionados (FIGURA 6C, seta). A formação de MPE a partir dos ES transferidos para a fase de maturação foi verificada principalmente nos tratamentos em meio de cultura contendo carvão ativado (FIGURA 6D).

Dentre os tratamentos testados, a suplementação do meio de cultura com 60 g.L⁻¹ de PEG 6000 (FIGURA 6B-C) pode ser vista como benéfica para a maturação dos embriões somáticos de jabuticabeira. Com o uso deste composto, foi obtido menor porcentagem de ES em estágio globular e maior porcentagem de ES em estádios mais avançado de desenvolvimento (cordiforme, torpedo e cotiledonar). Além disso, o uso de PEG 6000 resultou em maior tamanho dos ES formados.

FIGURA 6 – MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), 30 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA DAS MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS PARA MEIO MS CONTENDO DIFERENTES COMPOSTOS. A – EMBRIOGÊNESE REPETITIVA EM TRATAMENTO CONTROLE; B - MEIO DE CULTURA CONTENDO 30 G.L⁻¹ DE PEG 6000, APRESENTANDO ES SEM COTILÉDONES (SETA); C - MEIO CONTENDO 60 G.L⁻¹ DE PEG 6000, APRESENTANDO ES FUSIONADOS (SETA); D - MPE EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 0,5 G.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO, MOSTRANDO A EMBRIOGÊNESE REPETITIVA (SETA).



FONTE: O autor (2017)

Em algumas espécies vegetais, pode haver o requerimento de alta osmolaridade para a maturação, de maneira semelhante ao que acontece nos embriões zigóticos (MERKLE et al., 1995). Substâncias osmóticas plasmolisantes (sacarose, maltose e sorbitol) possuem baixo peso molecular e atravessam a parede celular rapidamente, causando plasmólise temporária até que seu movimento para o citosol leve à recuperação osmótica (ATTREE; FOWKE, 1993). Assim, a disponibilidade hídrica não é afetada em longo prazo e pode haver efeitos diversos devido ao metabolismo do soluto ou sua toxicidade (ATTREE; FOWKE, 1993). Dentre os agentes osmóticos permeáveis, apenas o sorbitol exibiu bons resultados na maturação dos ES de jaboticabeira, uma vez que estes se desenvolveram do estágio

globular para o cordiforme. Por outro lado, na embriogênese de *Castanea sativa*, a combinação de sacarose e maltose foi eficiente para estimular o crescimento dos embriões somáticos, enquanto o sorbitol apresentou efeitos negativos sobre as culturas (CORREDOIRA et al., 2003). Este açúcar-álcool apresenta bons resultados durante a maturação de *C. sativa*, porém manifesta efeitos negativos em sua subsequente conversão, sugerindo a toxicidade da concentração testada (60 g.L⁻¹).

Como observado para jabuticabeira, a adição de PEG ao meio de cultura pode estimular o desenvolvimento dos embriões somáticos em fase de maturação. Nesse caso, é possível que o PEG tenha afetado positivamente o acúmulo de compostos de reserva, de maneira similar àqueles acumulados nos embriões zigóticos (MISRA et al., 1993). Substâncias osmóticas não permeáveis, como o PEG, são moléculas de alto peso molecular incapazes de atravessar a parede celular, e permanecem no meio de cultura, levando a uma redução na pressão de turgor das células (ATTREE; FOWKE, 1993). Assim, esse tipo de agente osmótico restringe a disponibilidade de água, expondo os embriões somáticos a uma condição de estresse hídrico (JALALI et al., 2017). Nesse caso, o reestabelecimento da disponibilidade de água no interior das células só é possível mediante aumento na concentração de solutos dentro da célula (ATTREE; FOWKE, 1993), levando ao acúmulo de produtos de reserva no embrião, como lipídios e proteínas (MISRA et al., 1993). O PEG é normalmente utilizado durante a maturação de coníferas (ATTREE; FOWKE, 1993; MISRA et al., 1993), mas também apresentou resultados positivos para *Hevea brasiliensis* (LINOSSIER et al., 1997), *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007), *Psidium guajava* (BAJPAI et al., 2016) e *Juglans regia* (JALALI et al., 2017).

3.1.3.2 Maturação em diferentes concentrações de PEG 6000

Após 30 dias em meio de maturação, as maiores percentagens de embriões em estágio globular foram obtidas em meio sem PEG 6000 (TABELA 10; ANEXOS 3.35-3.38; FIGURA 7A) ou suplementados com 30 g.L⁻¹ (FIGURA 7B). À medida que a concentração de PEG foi aumentada, também foi observado o aumento no número de embriões maduros. Novamente foram observadas anormalidades morfológicas nas culturas, principalmente a presença de ES fundidos (FIGURA 7A).

TABELA 10 – MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) CONFORME CONCENTRAÇÃO DE POLIETILENOGLICOL (PEG 6000), 30 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE MATURAÇÃO

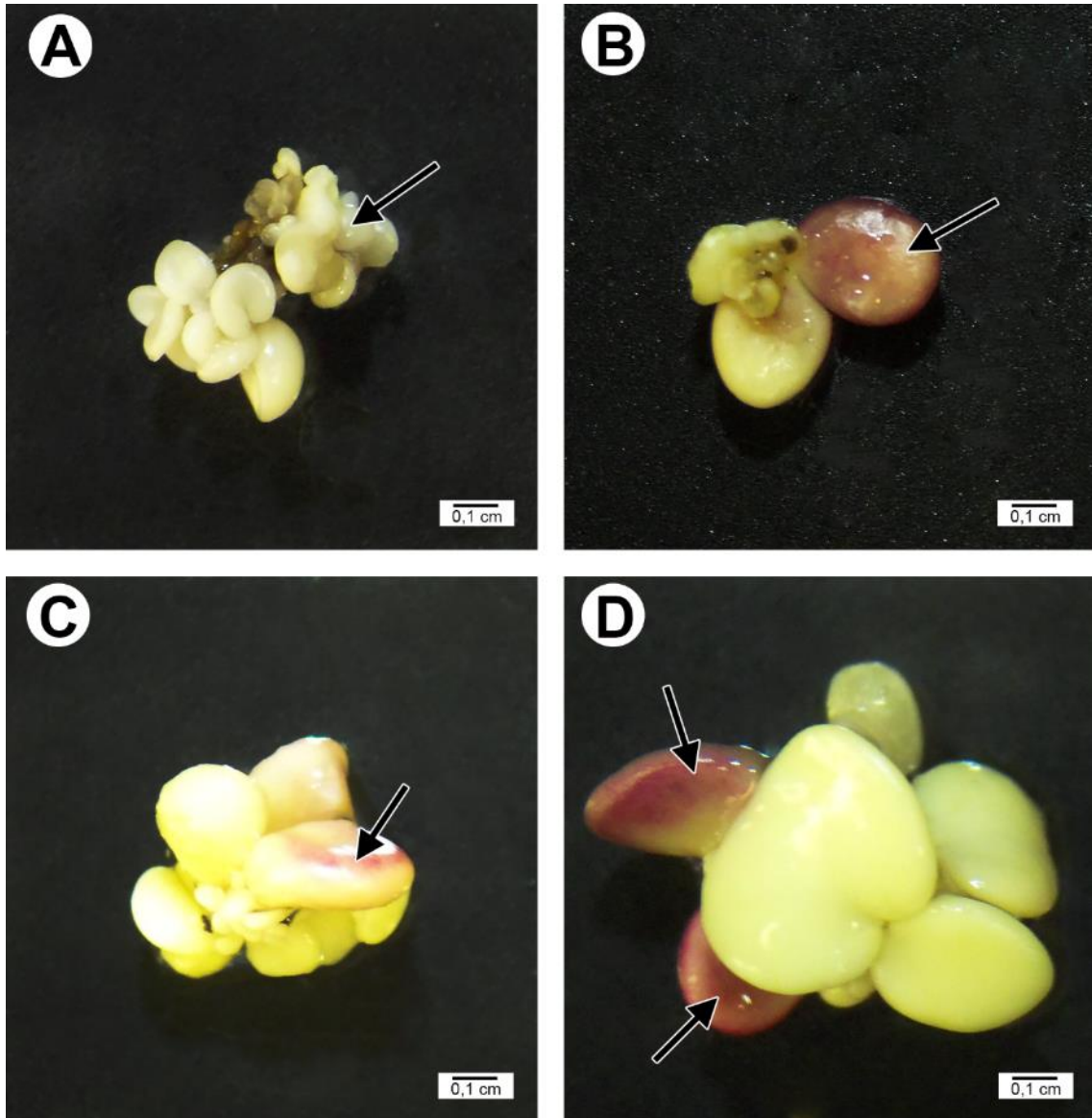
CONCENTRAÇÃO DE PEG 6000 (g.L ⁻¹)	PORCENTAGEM DE EMBRIÕES SOMÁTICOS			
	GLOBULAR	MADUROS	TAMANHO >2MM	TAMANHO >5MM
0	54,0 a	46,0 b	10,0 b	0,0 b
30	44,0 a	56,0 b	28,0 ab	8,0 b
60	18,0 b	82,0 a	34,0 ab	14,0 ab
90	18,0 b	82,0 a	40,0 a	24,0 a
Média	33,5	66,5	28,0	11,5

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. Média de dois ensaios independentes.

Os resultados obtidos indicam que o PEG promoveu o desenvolvimento dos ES, uma vez que provocou uma redução na porcentagem de embriões que permaneceram em estágio globular, ou seja, permitiu o avanço dos ES para os estádios mais avançados de desenvolvimento. A concentração de 60 g.L⁻¹ foi suficiente para a transição dos ES do estágio globular para os seguintes. Além disso, a suplementação do meio de cultura com PEG 6000 também resultou no aumento no tamanho dos ES. Quanto maior a concentração de PEG 6000 utilizada, maior foi o número de ES maiores do que 2 mm e 5 mm (FIGURA 7A-D). O aumento na concentração de PEG 6000 para acima de 90 g.L⁻¹ é dificultado devido à sua solubilidade parcial em água. Em tratamento preliminar utilizando 120 g.L⁻¹ de PEG, por exemplo, houve precipitação do composto mesmo após autoclavagem, impossibilitando o uso do meio de cultura.

Além do maior tamanho, também foi observada a coloração arroxeada dos embriões somáticos submetidos à maturação em meio de cultura contendo PEG 6000 (FIGURA 7B-D, setas). A síntese de antocianinas e outros pigmentos pode ser estimulada durante a maturação de espécies como *Theobroma cacao* (PENNY et al., 1979) e *Populus deltoides* (THOLAKALABAVI et al., 1994). Segundo Tholakalabavi et al. (1994), esse aumento nos níveis de antocianina está relacionado ao estresse osmótico, que inibe a divisão celular e estimula a síntese de metabólitos secundários. Ademais, a jabuticabeira apresenta reconhecida síntese de antocianinas, visto que estes pigmentos são os principais constituintes de seus frutos (WU et al., 2013).

FIGURA 7 – MATURAÇÃO DE ES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), 30 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA PARA MEIO MS CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PEG 6000. A - TRATAMENTO CONTROLE, SEM ADIÇÃO DE PEG 6000, APRESENTANDO ES FUNDIDOS (SETA); B - ES EM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DE 30 G.L⁻¹ DE PEG 6000, CONTENDO ANTOCIANINAS (SETA); C - ES DE COLORAÇÃO ARROXEADA (SETA) EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 60 G.L⁻¹ DE PEG 6000; D - ES EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 90 G.L⁻¹ DE PEG 6000, COM A PRESENÇA DE ANTOCIANINAS (SETA).



FONTE: O autor (2017)

Em culturas de *Hevea brasiliensis*, assim como no presente estudo, a adição de PEG ao meio de cultura resultou no desenvolvimento dos ES para estádios mais avançados, reduzindo a porcentagem de embriões nos estádios embriogênicos iniciais (LINOSSIER et al., 1997). O estresse abiótico, especialmente por alta concentração salina, pode estimular o desenvolvimento dos embriões somáticos (NICCAN et al., 2016). A redução do potencial osmótico é um método de maturação usado

na maioria das gimnospermas e espécies lenhosas (HOLOBIUC, 2015). Segundo Rudiyanto et al. (2014), o PEG inibe a proliferação dos embriões globulares e estimula seu desenvolvimento e posterior conversão. Seu efeito imita o estresse hídrico que ocorre naturalmente nas sementes nos estádios tardios da maturação (STASOLLA et al., 2003). Esse agente osmótico promoveu a maturação de embriões somáticos de *Psidium guajava* (BAJPAI et al., 2016) e *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007).

3.1.3.3 Maturação em diferentes concentrações de ácido abscísico

A adição de ácido abscísico ao meio de cultura não resultou em diferença estatística em relação ao controle para os estádios de desenvolvimento e tamanho dos ES durante a maturação (TABELA 11; ANEXOS 3.39-3.42; FIGURA 8A-H). O uso de 50 μM de ABA resultou no escurecimento e posterior necrose de alguns ES, indicando efeito fitotóxico desse regulador quando em altas concentrações (FIGURA 8H).

TABELA 11 – MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) CONFORME CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA), 30 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA PARA MEIO DE MATURAÇÃO

ABA (μM)	PORCENTAGEM DE EMBRIÕES SOMÁTICOS			
	GLOBULAR ^{ns}	MADUROS ^{ns}	TAMANHO >2MM ^{ns}	TAMANHO >5MM ^{ns}
0	36,0	64,0	12,0	0,0
0,1	34,0	66,0	12,0	0,0
0,5	38,0	62,0	18,0	0,0
1	38,0	62,0	22,0	4,0
5	30,0	70,0	18,0	4,0
10	20,0	80,0	28,0	2,0
50	50,0	50,0	6,0	0,0
Média	35,1	64,9	16,5	1,4

Foi aplicado o teste SNK a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. Média de dois ensaios independentes.

A coloração arroxeadada causada pela síntese de antocianinas foi observada nos tratamentos contendo de 0,1 a 1 μM de ABA (FIGURA 8C-E). No tratamento controle (FIGURA 8A) e em concentrações de ABA acima de 5 μM (FIGURA 8F-H), não foi verificada a presença desse pigmento. Em culturas de *Theobroma cacao*, o

aumento na concentração de antocianinas está correlacionado à adição de ABA ao meio de cultura e à efetiva maturação dos embriões somáticos (PENCKE, 1992).

O efeito do ABA na maturação dos embriões somáticos está relacionado ao acúmulo de substâncias de reserva, que posteriormente são consumidas durante a conversão (MISRA et al., 1993). O ABA também pode estar envolvido na absorção de açúcares para o desenvolvimento dos cotilédones (PENCKE, 1992). Da mesma forma que para jabuticabeira, no caso de *Hevea brasiliensis*, o ABA não aumentou a taxa de desenvolvimento dos embriões globulares ao estágio torpedo, independentemente da concentração testada (LINOSSIER et al., 1997). Nessa espécie, o PEG foi considerado a melhor alternativa para a maturação dos ES (LINOSSIER et al., 1997).

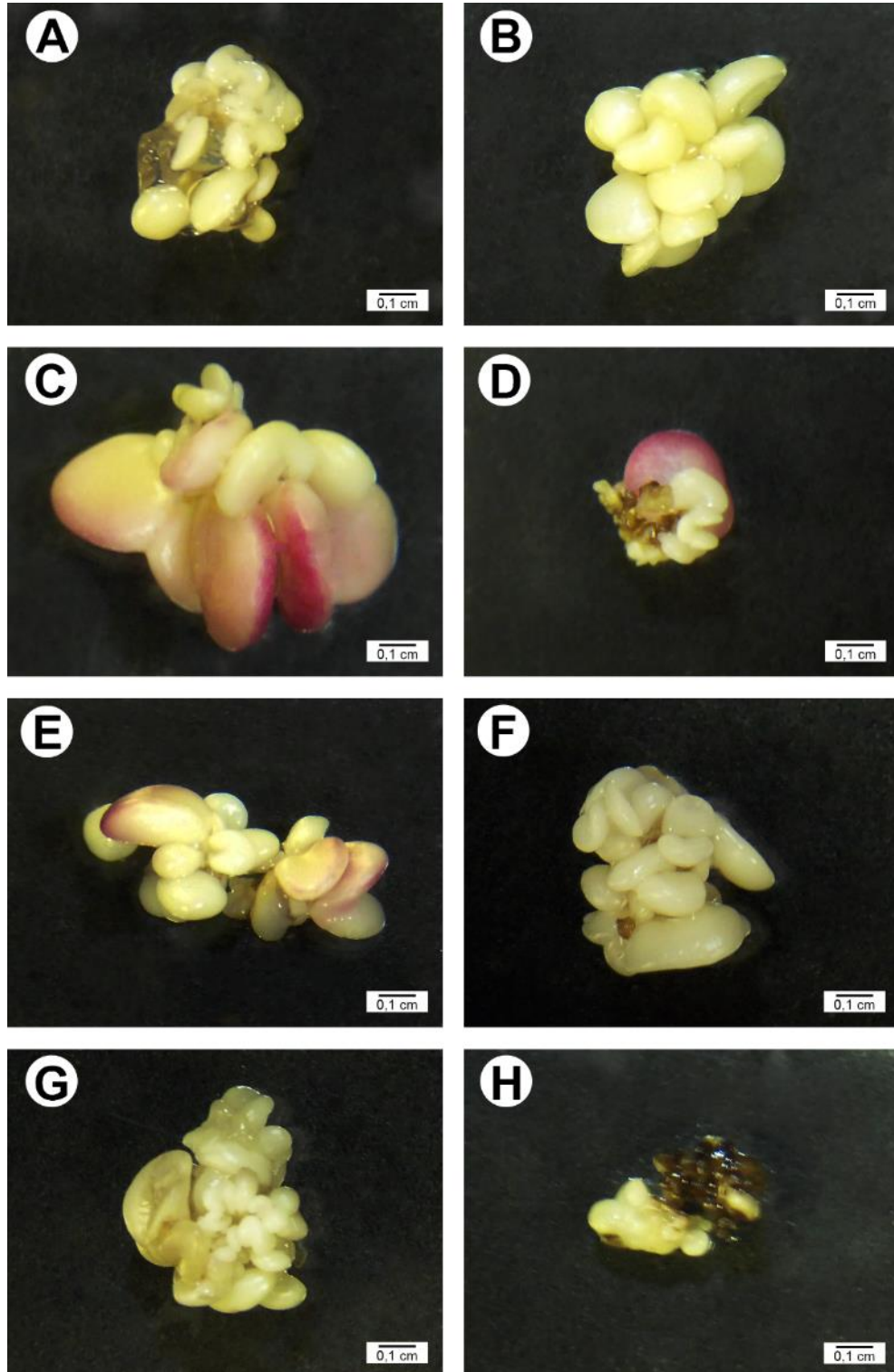
3.1.4 Conversão dos embriões somáticos

Dois dias após a transferência para a luz em meio de cultura contendo concentrações variáveis de GA₃ (0; 1,44; 2,88 ou 5,77 µM), os embriões somáticos adquiriram coloração esverdeada. Contudo, após 30 dias, nenhum dos embriões apresentou emissão da radícula. Os embriões foram transferidos para meio fresco a cada mês, porém, mesmo após 90 dias, não apresentaram qualquer sinal de conversão, mantendo-se verdes por todo o período.

Ao contrário do observado neste estudo, o GA₃ apresentou efeitos benéficos na conversão de algumas espécies, como *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; CANHOTO e CRUZ, 1994; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007; GUERRA et al., 2013), *Acanthopanax seoulenses* (KANG et al., 2014) e *Panax quinquefolius* (ZHOU e BROWN, 2006). Seu modo de ação está relacionado com a quebra de dormência, porém seu efeito é limitado à proporção de embriões normais formados (CRUZ et al., 1990).

Para várias espécies, a conversão é considerada um estágio crítico para o estabelecimento de um protocolo de embriogênese somática eficiente (GAJ, 2004; BAJPAI et al., 2016). Segundo von Arnold et al. (2002), para que a conversão ocorra, é necessário que os ES apresentem morfologia normal. Porém, a identificação de condições de cultura ideais para a embriogênese somática pode ser extremamente complexa devido ao grande número de fatores que contribuem para a indução, desenvolvimento e conversão dos embriões somáticos (GUTIÉRREZ-MORA et al., 2012).

FIGURA 8 – MATURAÇÃO DE ES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), 30 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA PARA MEIO MS CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ABCSÍICO (ABA). A - ES EM TRATAMENTO CONTROLE; B - ES EM ESTÁDIO GLOBULAR E CORDIFORME, EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 0,1 G.L⁻¹ DE ABA; C - 0,1 G.L⁻¹; D - 0,5 G.L⁻¹; E - 1 G.L⁻¹; F - 5 G.L⁻¹; G - 10 G.L⁻¹ DE ABA; H - ES E MPE EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 50 G.L⁻¹ DE ABA.



FONTE: O autor (2017)

Segundo Cangahuala-Inocente et al. (2007), um dos fatores determinantes para as baixas taxas de conversão dos embriões somáticos está associado ao efeito residual do 2,4-D. A exposição prolongada ao 2,4-D durante as etapas de indução (2 meses) e proliferação das MPEs (6 meses) poderia explicar a ausência de conversão dos embriões somáticos de jabuticabeira. Longos períodos de exposição ao 2,4-D resultam em anormalidades nos embriões somáticos (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992), muitas vezes devido à má-formação de meristemas ou protoderme (BENELLI et al., 2010).

Como observado para *Acca sellowiana*, ES formados na presença de 10 a 20 μM dessa auxina por mais de 15 semanas exibem morfologia anormal e, conseqüentemente, apresentaram baixa taxa de conversão (DAL VESCO; GUERRA, 2001; GUERRA et al., 2001; PESCADOR et al., 2008). Para esta espécie, considerada referência para os estudos de embriogênese somática, as taxas de conversão variam de 10% a cerca de 25% (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007; PESCADOR et al., 2008). Ao utilizar um tratamento com pulso de 2,4-D por apenas 1 hora, a taxa de conversão foi aumentada para 35% (FRAGA et al., 2012).

3.2 INICIAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS EM VÁRIOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO 2,4-D

3.2.1 Indução de massas pró-embriogênicas em diferentes tempos de exposição ao 2,4-D

Aos 60 dias, não houve diferença estatística entre os tratamentos testados para as variáveis avaliadas (TABELA 12; ANEXOS 3.43-3.47). Em alguns casos, a germinação do eixo embrionário foi observada, evidenciando inclusive a poliembrionia da espécie (FIGURA 9A, seta).

No presente trabalho, a exposição por 7 dias em 2,4-D foi suficiente para a formação de MPEs (FIGURA 9B). A determinação de um tempo de permanência mínimo para a indução da embriogênese é importante para diminuir os impactos negativos do 2,4-D, uma vez que, diferentemente de auxinas naturais como o AIA, o 2,4-D não sofre degradação dentro das células (NIC-CAN; LOYOLA-VARGAS, 2016). A manutenção das culturas por longos períodos na presença desse fitorregulador pode resultar em efeitos indesejados no desenvolvimento dos embriões somáticos,

como ausência da conversão (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992) ou anormalidades morfológicas (PESCADOR et al., 2008).

TABELA 12 – FORMAÇÃO DE CALOS, MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS (MPE), MASSAS CONTENDO EMBRIÕES SOMÁTICOS (ES), EXPLANTES COM RAÍZES (ER) E EIXOS EMBRIONÁRIOS GERMINADOS (EG) EM CULTURAS DE SEMENTES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), CONFORME TEMPO DE EXPOSIÇÃO A 10 μ M 2,4 D EM MEIO DE CULTURA MS, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*

TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO 2,4-D	% CALOS ^{ns}	% MPE ^{ns}	% ES ^{ns}	% ER ^{ns}	% EG ^{ns}
7 dias	82,5	36,3	22,5	41,3	18,8
15 dias	92,5	50,0	26,3	40,0	20,0
30 dias	92,5	53,8	27,5	37,5	6,3
45 dias	75,0	45,0	20,0	38,8	6,3
60 dias	85,0	55,0	30,0	32,5	6,3
Média	85,5	48,0	25,3	38,0	11,5

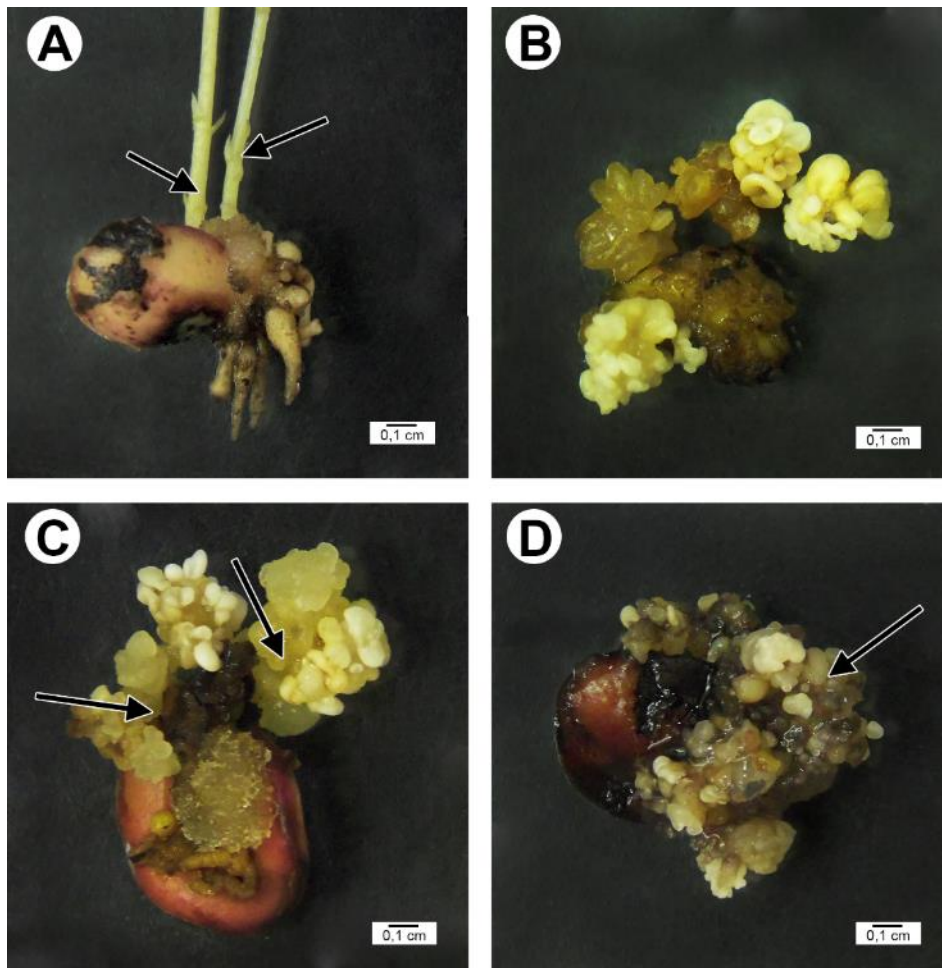
Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. Média de dois ensaios independentes.

Para *Acca sellowiana*, a permanência dos explantes por no mínimo cinco dias em 2,4-D é necessária para desencadear as respostas embriogênicas (CRUZ et al., 1990). Nessa espécie, a frequência da embriogênese é aumentada quando o período de exposição é de 14 dias, mantendo-se semelhante até os três meses de cultura na presença do regulador (CRUZ et al., 1990; GUERRA et al., 2001). Contudo, o período de quatro meses afeta negativamente a indução e desenvolvimento dos ES (GUERRA et al., 2001). Segundo modelos matemáticos, a maior porcentagem de indução para *A. sellowiana* é estimada quando os explantes são expostos ao 2,4-D por 60 dias (GUERRA et al., 2001). Em estudo realizado com *Psidium guajava*, o uso de 2,4-D por oito dias é mais eficiente para a indução da embriogênese somática, se comparado à permanência dos explantes durante 60 dias na presença do regulador (RAI et al., 2007). Nessa espécie, períodos de exposição ao 2,4-D inferiores a 8 dias são considerados insuficientes para a formação dos embriões somáticos (AKHTAR, 2013).

Nos tratamentos com 2,4-D por períodos de 7 a 15 dias, foi observada a predominância da embriogênese somática direta (ESD) (FIGURA 9B). Ao contrário, nos experimentos em que o explante foi exposto ao 2,4-D por 60 dias, a principal rota embriogênica foi indireta (ESI), com a formação prévia de massas pró-embriogênicas (FIGURA 9C-D, setas). Na ESD, células competentes já estão presentes e o início da

embriogênese somática apenas depende de condições de cultura favoráveis (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). A ESI envolve uma fase intermediária onde células indeterminadas proliferam em calos indiferenciados (VON ARNOLD et al., 2002). A embriogênese somática direta é geralmente a rota preferível, uma vez que a formação de calos aumenta o risco de variação somaclonal, indesejada na maioria dos métodos de propagação clonal (LITZ; GRAY, 1995).

FIGURA 9 – CULTURA DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*), 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO* EM MEIO MS COM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO A 10 μ M DE 2,4-D. A - EXPLANTE GERMINADO APÓS PERMANECER 7 DIAS EM MEIO DE CULTURA COM 2,4-D, APRESENTANDO POLIEMBRIONIA (SETAS); B - MASSA PRÓ-EMBRIOGÊNICA CONTENDO EMBRIÕES SOMÁTICOS, EM TRATAMENTO DURANTE 7 DIAS NA PRESENÇA DE 2,4-D; C - MASSA PRÓ-EMBRIOGÊNICA (SETA) E EMBRIÕES SOMÁTICOS FORMADOS EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 2,4-D APÓS 30 DIAS; D - MASSA PRÓ-EMBRIOGÊNICA (SETA) E EMBRIÕES SOMÁTICOS EM MEIO COM 2,4-D DURANTE 60 DIAS.



FONTE: O autor (2017)

Em algumas espécies de Myrtaceae, ocorre a formação de ES diretamente a partir dos tecidos da superfície dos explantes (RAI et al., 2007), enquanto outras

apresentam uma fase intermediária de calo (CANHOTO et al., 1999). No caso de *Acca sellowiana*, ambas as rotas são descritas (CRUZ et al., 1990; CANHOTO; CRUZ, 1996b; CANHOTO et al., 1996; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007; GUERRA et al., 2011; FRAGA et al., 2012; PESCADOR et al., 2012; 2013). Estudos de Pescador et al. (2012, 2013) exploraram a correlação entre a rota embriogênica e o tempo de permanência em 2,4-D nesta espécie. Nesse caso, a predominância da ESD parece estar ligada a protocolos que utilizam tratamento pulso com 2,4-D (GUERRA et al., 2011; FRAGA et al., 2012). Ao contrário, há uma tendência à ESI quando os explantes são expostos ao 2,4-D por períodos mais longos do que 15 dias, como mostrado nos protocolos de CRUZ et al. (1990) e CANGAHUALA-INOCENTE et al. (2004).

3.2.2 Manutenção e proliferação das massas pró-embriogênicas

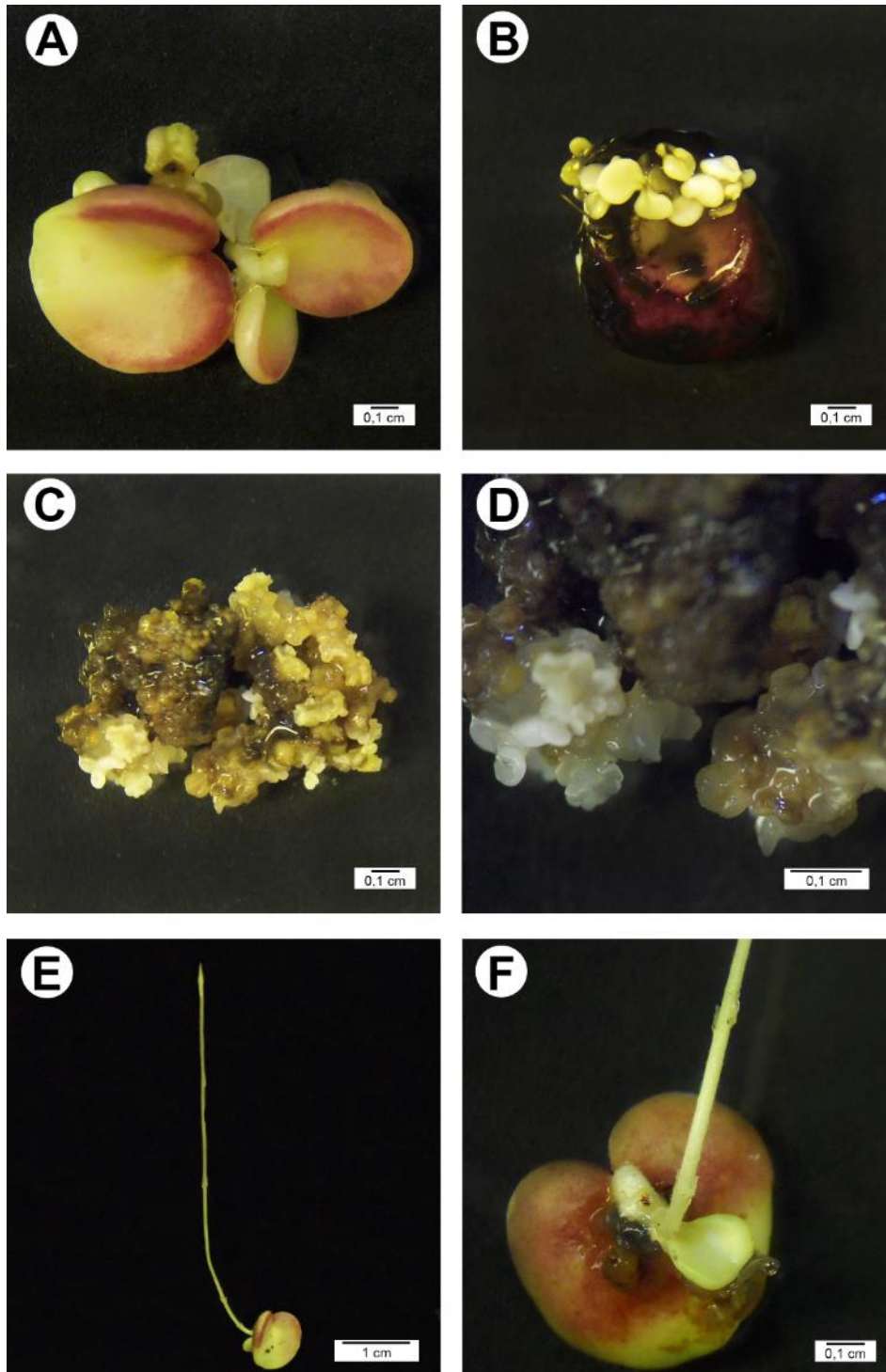
Após 60 dias do experimento de indução, as massas pró-embriogênicas e embriões somáticos obtidos em todos os tratamentos foram transferidos para meio de cultura sem reguladores, sendo repicados para meio fresco a cada 30 dias. Após 60 dias na ausência de 2,4-D, mesmo sem diferença na porcentagem de formação de MPEs (média de 48%) e ES (média de 25%) na etapa anterior, o estágio de desenvolvimento e o tamanho dos embriões diferiu em função do tratamento (FIGURA 10A-D).

No caso do tratamento em meio de cultura contendo 2,4-D por 7 dias, os ES apresentaram maior tamanho, de forma semelhante àqueles obtidos em meio de maturação contendo PEG 6000 (item 3.1.3.2; FIGURA 10A), inclusive com a presença de antocianinas. Por outro lado, as MPE e ES formados em meio contendo 2,4-D por 60 dias apresentaram tamanho reduzido, desenvolvimento mais lento e ausência de pigmentos (FIGURA 10C-D).

Após 60 dias em meio sem regulador e no escuro, foi observada a conversão de um dos ES formados no tratamento com exposição ao 2,4-D por 7 dias (FIGURA 10E). No entanto, a planta formada não apresentou raízes (FIGURA 10F).

Para jaboticabeira, é possível que tempos de exposição ainda mais curtos do que os testados no presente estudo, aliados a concentrações mais elevadas de 2,4-D, sejam capazes de estimular as respostas embriogênicas das culturas. Os embriões somáticos obtidos em menor tempo de 2,4-D podem apresentar maior tamanho, bem como melhor desenvolvimento nas fases de maturação e conversão.

FIGURA 10 – DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) EM MEIO MS SEM REGULADORES, 60 DIAS APÓS O TÉRMINO DOS TRATAMENTOS DE INDUÇÃO UTILIZANDO 2,4-D. A - EMBRIÕES SOMÁTICOS FORMADOS EM MEIO COM 2,4-D POR 7 DIAS; B - EMBRIÕES SOMÁTICOS FORMADOS EM MEIO COM 2,4-D POR 15 DIAS, APRESENTANDO MENOR TAMANHO; C - MPE FORMADA EM MEIO CONTENDO 2,4-D POR 60 DIAS; D - EMBRIÕES SOMÁTICOS DE TAMANHO REDUZIDO FORMADOS EM MEIO CONTENDO 2,4-D POR 60 DIAS; E - CONVERSÃO DE EMBRIÃO SOMÁTICO OBTIDO EM TRATAMENTO POR 7 DIAS EM 2,4-D, NO ESCURO; F - DETALHE DE CONVERSÃO DE EMBRIÃO SOMÁTICO, SEM A PRESENÇA DE RAÍZES.



FONTE: O autor (2017)

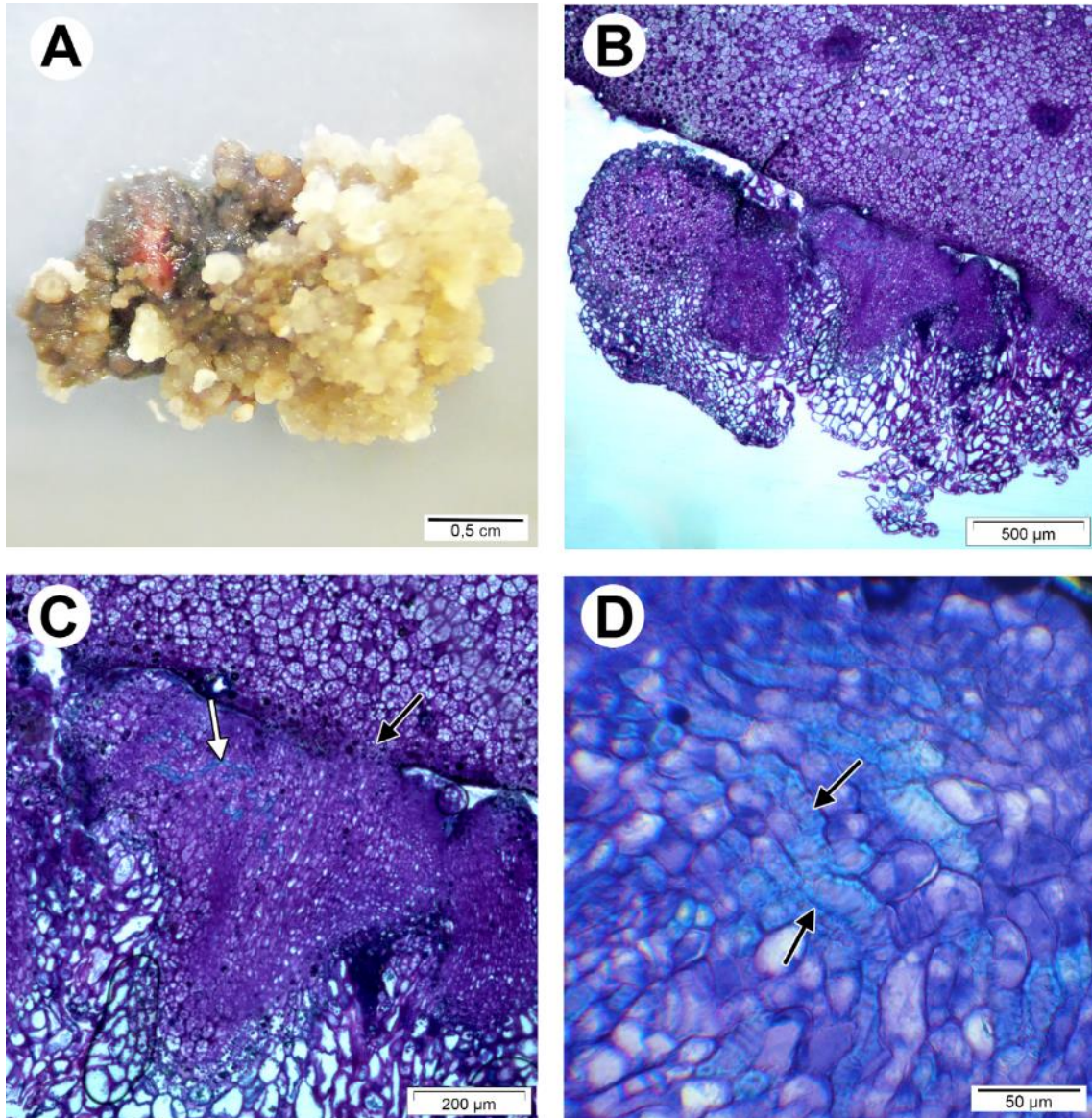
3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As massas pró-embriogênicas formadas a partir de sementes maduras exibiram um aspecto friável, de coloração variando de amarelo a marrom claro (FIGURA 11A). Por meio de cortes histológicos, foi possível verificar a presença de inúmeros grãos de amido nos cotilédones introduzidos *in vitro*, evidenciando a grande quantidade de produtos de reserva (FIGURA 11B). Embriões somáticos se desenvolveram a partir de células da periferia dos cotilédones, diretamente ou com a formação de calos. Assim como no presente trabalho, os processos de embriogênese direta e indireta acontecem simultaneamente em culturas de *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990) e *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007).

Em relação à morfologia das massas pró-embriogênicas, pode-se observar a presença de regiões contendo células de citoplasma denso, redondas, compactas, organizadas e de pouca vacuolização, circundadas por células maiores, com grande vacúolo e aparência desorganizada (FIGURA 11B). As células menores correspondem a células meristemáticas, com alta atividade mitótica, em contraste com a baixa atividade meristemática das células da periferia. Segundo Fehér (2005), a morfologia descrita para as células em intensa divisão é característica de células embriogênicas, semelhantes a células dos centros meristemáticos e zigotos.

Próximo aos locais de origem dos ES e calos ocorre o acúmulo de compostos fenólicos no interior das células do explante (FIGURA 11C, seta preta). O acúmulo de compostos fenólicos também é observado nas células não-embriogênicas que circundam as zonas meristemáticas (FIGURA 11B-C). A presença de polifenóis nas células parenquimáticas que se localizam ao redor dos centros meristemáticos também foi relatada para *Acca sellowiana* (CANHOTO; CRUZ, 1996b) e *Theobroma cacao* (GALLEGO RÚA et al., 2016). Segundo Reis et al. (2008), existe uma forte relação entre o desenvolvimento de embriões somáticos e a presença de células ricas em compostos fenólicos. Sugere-se que a distribuição de compostos fenólicos na periferia dos ES pode refletir o processo natural que ocorre em embriões zigóticos, nos quais os polifenóis formam uma barreira contra injúrias e infecções (GALLEGO RÚA et al., 2016).

FIGURA 11 – MORFOANATOMIA DE CALO FORMADO A PARTIR DE SEMENTES MADURAS DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*). A - ASPECTO MORFOLÓGICO DE MASSA PRÓ-EMBRIOGÊNICA (MPE) FORMADA A PARTIR DE COTILÉDONE; B - CORTE HISTOLÓGICO DE MPE; C – FORMAÇÃO DE TECIDOS VASCULARES EM MPE (SETA BRANCA) E PRESENÇA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO EXPLANTE INICIAL (SETA PRETA); D - DETALHE DE ESPESSAMENTO DAS CÉLULAS DE XILEMA (SETAS).



FONTE: O autor (2017)

No interior da massa pró-embriogênica, é possível verificar a formação de tecidos vasculares (FIGURA 11C, seta branca) sem conexão com o explante inicial. O espessamento característico das paredes celulares dos elementos traqueais do xilema aparece corado em azul claro (FIGURA 11D, setas).

3.3.1 Indução de massas pró-embriogênicas após período prolongado de 2,4-D

A morfologia externa dos embriões somáticos obtidos em meio contendo 2,4-D por longos períodos de tempo (FIGURA 12A) assemelha-se àquela apresentada pelos embriões obtidos em tratamento por tempo reduzido em 2,4-D (FIGURA 12B), inclusive no que se refere à presença de antocianinas. Os embriões somáticos em estágio globular, obtidos após 60 dias em meio de cultura de indução contendo 2,4-D, apresentam protoderme definida e delimitação de tecido vascular. Contudo, anormalidades morfológicas surgem à medida que se desenvolvem.

Nos cortes transversais de embriões somáticos na fase cordiforme, foi possível identificar a presença de um tecido de cicatrização (FIGURA 12C). Essa estrutura também esteve presente nos embriões em estágio torpedo, em alguns casos ocupando praticamente toda a porção central do embrião (FIGURA 12E). O tecido de cicatrização é caracterizado por células volumosas, de paredes celulares finas, que isolam as áreas necróticas do tecido não afetado (TUFFI-SANTOS et al., 2009). Além disso, o acúmulo de compostos fenólicos no interior do tecido evidencia mecanismos de defesa, desencadeados em resposta ao estresse (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006, 2014).

De acordo com Dickison (2000), a existência de um tecido de cicatrização é normalmente associada a respostas de defesa da planta, no esforço de restringir danos a uma área menor de tecido, um processo denominado compartimentalização. As respostas de defesa podem ser desencadeadas por diversos tipos de estresse, incluindo o causado por chuva ácida (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006), herbicidas (TUFFI-SANTOS et al., 2009) e poluentes atmosféricos (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2014). O isolamento e a compartimentalização envolvem barreiras físicas e químicas, incluindo a produção de compostos fenólicos, com lignificação e suberização das paredes celulares (DICKISON, 2000). Alterações morfológicas semelhantes às do presente trabalho, com ocorrência de tecidos de cicatrização, necrose e presença de células ricas em compostos fenólicos, são observadas em folhas de eucalipto expostas ao herbicida glifosato (TUFFI-SANTOS et al., 2009).

Anormalidades no desenvolvimento de embriões somáticos são descritas para várias espécies, sendo provavelmente causadas por condições de cultura inadequadas, como o tipo de fonte de carbono e os reguladores vegetais utilizados (BENELLI et al., 2010). A alta frequência de formação de embriões anormais em

culturas de *Acca sellowiana*, por exemplo, é associada ao efeito deletério do 2,4-D utilizado durante a fase de indução (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004; PESCADOR et al., 2008).

No presente trabalho, MPEs foram obtidos em meio de cultura contendo 10 μM de 2,4-D. É reconhecido que as auxinas desempenham um papel fundamental no início da embriogênese somática (VON ARNOLD et al., 2002; NIC-CAN; LOYOLA-VARGAS, 2016). Auxinas de origem sintética, como o 2,4-D, são muito eficientes durante a iniciação e proliferação de culturas, quando comparadas a auxinas naturais (JOSHI; KUMAR, 2013). Além do efeito auxínico, o 2,4-D é um importante causador de estresse nas culturas, sendo amplamente utilizado na indução da embriogênese somática de várias espécies (GAJ, 2004; FEHÉR, 2005; NIC-CAN; LOYOLA-VARGAS, 2016).

As MPEs de jabuticabeira mantiveram a capacidade de formar embriões somáticos, mesmo após um ano em meio de proliferação contendo 5 μM de 2,4-D. Segundo Litz e Gray (1995), é possível manter as massas embriogênicas por longos períodos em meio contendo a auxina, onde continuam se dividindo. Durante a fase de proliferação, contudo, a maturação é inibida (LITZ; GRAY, 1995; FEHÉR, 2005). Além disso, a permanência por longos períodos no 2,4-D poderia resultar em anormalidades que impedem o posterior desenvolvimento dos embriões somáticos que, quando anormais ou imaturos, são incapazes de germinar (MICHAUX-FERRIÈRE; SCHWENDIMAN, 1992).

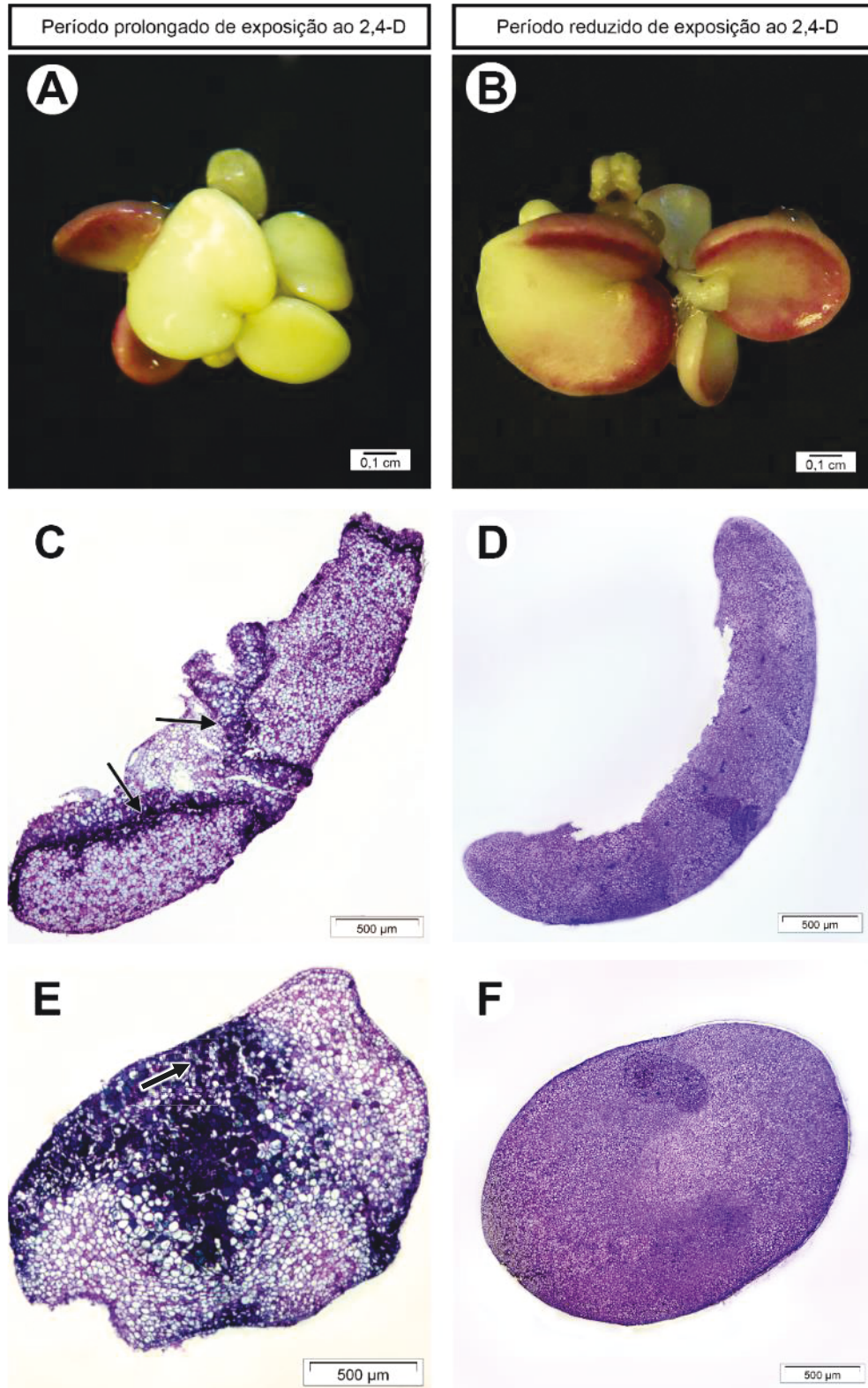
Conforme Moshkov et al. (2008), a exposição prolongada ou concentração excessiva de um regulador pode resultar no desenvolvimento diferente do desejado. Para que a conversão dos embriões ocorra, é necessário que eles atinjam um estado mínimo de maturação e condições fisiológicas que permitam a execução desse processo (PARROTT et al., 1988), ademais de apresentarem morfologia normal (VON ARNOLD et al., 2002). Embriões de *Trifolium repens* mantidos por mais de duas semanas em 2,4-D não ultrapassaram o estágio globular, mesmo quando transferidos para meio sem reguladores (PARROTT, 1991). No caso de *Acca sellowiana*, a manutenção das culturas embriogênicas por mais de 15 semanas na presença de 2,4-D causa anormalidades no desenvolvimento dos embriões e reduz sua taxa de conversão (DAL VESCO; GUERRA, 2001; GUERRA et al., 2001). Segundo Benelli et al. (2010), baixas taxas de conversão de embriões são muitas vezes relacionadas a anormalidades na formação de meristemas apicais ou protoderme.

De maneira similar ao presente trabalho, a formação de embriões anormais devido ao efeito do 2,4-D é documentada para outras espécies de Myrtaceae, principalmente para *Acca sellowiana* (DAL VESCO; GUERRA, 2001; GUERRA et al., 2001; PESCADOR et al., 2008). Segundo Pescador et al. (2008), é necessário explorar alternativas para minimizar ou eliminar os impactos negativos causados pelo uso praticamente obrigatório do 2,4-D na maioria das culturas. O estabelecimento de um tratamento pulso mínimo (CANHOTO et al., 1999) ou sua substituição por outro regulador (PESCADOR et al., 2008) poderiam ser alternativas para obtenção de embriões somáticos de morfologia e desenvolvimento adequados. Além disso, a redução no tempo de permanência no regulador pode estimular a embriogênese somática direta de jabuticabeira, uma vez que há o predomínio dessa rota em protocolos com tratamento pulso de 2,4-D (GUERRA et al., 2011; FRAGA et al., 2012; PESCADOR et al., 2012; 2013).

3.3.2 Indução de massas pró-embriogênicas em tratamento reduzido de exposição ao 2,4-D

Ao reduzir o tempo de permanência no meio contendo 2,4-D para 7 ou 15 dias, não houve a formação do tecido de cicatrização observado nos embriões que permaneceram longos períodos em meio contendo o regulador. Em cortes transversais de embriões somáticos, tanto em fase cordiforme quanto torpedo, essa estrutura não foi visualizada (FIGURA 12D e 12F). Além disso, os embriões somáticos obtidos apresentaram células de menor tamanho se comparadas àquelas presentes nos ES de morfologia anormal. Células pequenas, isodiamétricas e com conteúdo citoplasmático denso são características de tecidos com alta atividade mitótica, como os embriões zigóticos (FEHÉR, 2005). Por outro lado, a hipertrofia é uma das particularidades das células que circundam as áreas necróticas do tecido de cicatrização (TUFFI-SANTOS et al., 2009).

FIGURA 12 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DE EMBRIÕES DE JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) FORMADOS EM PERÍODO PROLONGADO DE 2,4-D (A-C-E) E APÓS TEMPO DE EXPOSIÇÃO REDUZIDO AO 2,4-D (B-D-F). A-B - APARÊNCIA EXTERNA DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS; C-D - CORTE TRANSVERSAL DE EMBRIÃO SOMÁTICO EM FASE CORDIFORME; E-F - CORTE TRANSVERSAL DE EMBRIÃO TORPEDO; SETAS: TECIDO DE CICATRIZAÇÃO.



FONTE: O autor (2017)

Embriões somáticos obtidos no presente trabalho apresentam anormalidades quando permanecem em 2,4-D por mais tempo do que o necessário para a indução de MPEs, assim como relatado para *Acca sellowiana* (DAL VESCO; GUERRA, 2001; GUERRA et al., 2001; PESCADOR et al., 2008). Como sugerido para culturas desta espécie (GUERRA et al., 2001), a manipulação correta do tempo de exposição e concentração do 2,4-D utilizado durante a fase de indução de embriogênese somática é um fator chave para o estabelecimento de um protocolo eficiente. O estabelecimento de um tratamento de pulso mínimo é importante para evitar as anormalidades morfológicas causadas pelo período prolongado de exposição aos reguladores utilizados na embriogênese somática (CANHOTO et al., 1999; MOSHKOV et al., 2008; PESCADOR et al., 2008).

Para jabuticabeira, o período de 7 dias em 2,4-D foi suficiente para desencadear as respostas embriogênicas, ao mesmo tempo que não são observados os efeitos deletérios do regulador. Períodos ainda menores de permanência no fitorregulador podem ser testados para otimizar o processo e reduzir os riscos de anormalidades nos embriões somáticos formados. Um tratamento pulso pode ser aplicado, mantendo os explantes imersos em solução de 2,4-D por apenas algumas horas, assim como descrito em protocolos de embriogênese somática de *Acca sellowiana* (FRAGA et al., 2012).

Estudos histológicos do material nos diferentes estádios de cultura provêm informações sobre a origem das estruturas obtidas e sua identidade (DOBROWOLSKA et al., 2017). Além disso, avaliações histológicas conduzidas juntamente com a manipulação dos componentes do meio de cultura são importantes para aumentar a eficiência dos protocolos e permitir a aplicação de estratégias mais apropriadas para a regeneração de plantas (WOO; WETZSTEIN, 2008). Conforme Michaux-Ferrière e Schwendiman (1992), sem as análises histológicas, a formação de embriões somáticos normais só poderia ser confirmada com a sua conversão.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho constitui o primeiro relato de um protocolo de embriogênese somática de jabuticabeira (*Plinia peruviana*) e a análise histológica dos embriões somáticos obtidos.

A formação de massas pró-embriogênicas e de embriões somáticos pode ser obtida utilizando meio de cultura MS, com adição de 10 μM de 2,4-D e 1000 mg.L^{-1} de glutamina. A polivinilpirrolidona reduz a oxidação das culturas, mas não afetou as respostas embriogênicas a curto prazo. Por outro lado, a BAP inibe a embriogênese dessa espécie nas concentrações de 2,5 e 5 μM .

O PEG 6000 apresenta efeitos positivos durante a fase de maturação e pode ser utilizado para estimular o desenvolvimento dos embriões somáticos. A etapa de conversão não foi bem estabelecida e está relacionada à morfologia anormal dos embriões somáticos obtidos.

O tecido de cicatrização, observado a partir de análises histológicas dos embriões somáticos de jabuticabeira, mostra o efeito deletério do longo período de exposição ao 2,4-D (60 dias) na fase de indução de massas pró-embriogênicas. Ao contrário, esse tecido não é observado quando os embriões somáticos são formados em período reduzido (7 a 15 dias) de exposição à auxina. Nessa espécie, o tempo de permanência em 2,4-D durante a fase de indução de massas pró-embriogênicas é um fator chave para a obtenção de embriões somáticos de qualidade. Portanto, recomenda-se a realização de novos estudos para verificar o tempo de exposição mínimo ao 2,4-D para iniciar as respostas embriogênicas e obter embriões somáticos de morfologia normal. Além disso, é importante caracterizar o tecido a partir do qual se formam os embriões somáticos, tanto na via direta quanto indireta, e classificar sua origem como uni ou multicelular.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1679-1687, 2012.
- AKHTAR, N. Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 556-562, 2010.
- AKHTAR, N. Somatic embryogenesis for efficient micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) In: LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; JAIN, S. M. (Eds.) **Protocols for micropropagation of select economically-important horticultural plants**. New York: Humana Press, 2013. p. 161-177.
- AL-KHAYRI, J. M.; Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant)**, v. 37, p. 453-456, 2001.
- ALEXANDRE, R. S.; WAGNER JÚNIOR, A.; NEGREIROS, J. R. S.; BRUCKER, C. H. Estádio de maturação dos frutos e substratos na germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 2, p. 227-230, 2006.
- ALMEIDA-TEIXEIRA, G. H.; BERLINGIERI DURIGAN, M. F.; DURIGAN, J. F. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. [Myrtaceae]). In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits**. New Dehli: Woodhead Publishing, 2011. p. 246-274.
- ASAD, S.; ARSHAD, M.; MANSOOR, S.; ZAFAR, Y. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1214-1218, 2009.
- ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 1-35, 1993.
- AZOIFEFA, A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. **Agronomia Mesoamericana**, v. 20, n. 1, p. 153-175, 2009.
- BAJPAI, A.; KALIM, S.; CHANDRA, R.; KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-12, 2016.
- BENELLI, C.; GERMANÀ, M. A.; GANINO, T.; BEGHE, D.; FABBRI, A. Morphological and anatomical observations of abnormal somatic embryos from anther cultures of *Citrus reticulata*. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 224-230, 2010.

BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33-40, 2004.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; TORRES, A. C.; GUERRA, M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in *Feijoa* (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 228-234, 2007.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C. A.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** (Plant), v. 50, p. 166-175, 2014.

CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** (Plant), v. 30, n. 1, p. 21-25, 1994.

CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. *Feijoa sellowiana* Berg (pineapple guava). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry 35. **Trees IV**. New Delhi: Springer, 1996a. p. 155-171.

CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). **Protoplasma**, v. 191, p. 34-45, 1996b.

CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 78, p. 513-521, 1996.

CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 13-21, 1999.

CARLSSON, J.; SVENNERSTAM, H.; MORITZ, T.; EGERTSDOTTER, U.; GANETEG, U. Nitrogen uptake and assimilation in proliferating embryogenic cultures of Norway spruce – Investigating the specific role of glutamine. **Plos One**, v. 12, n. 8, 2017.

CASSOL, D. A.; WAGNER JÚNIOR, A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I. Embalagem, época e ácido indolbutírico na propagação de jaboticabeira por alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 267-272, 2015.

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticaba trees (*Plinia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343, 2010.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. **Annals of Botany**, v. 92, p. 129-136, 2003.

CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; VIEITEZ, A. M. Morphological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 42, p. 525-533, 2006.

CRUZ, G. S.; CANHOTO, J. M.; ABREU, M. A. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, v. 66, p. 263-270, 1990.

DAL VESCO, L. L. **Indução e controle da embriogênese somática in vitro na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg)**. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 1998.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 19-25, 2001.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JÚNIOR, A. A.; ASSMANN, A. P.; MAZARO, S. M.; DONAZZOLO, J.; SASSO, S. A. Z. Enraizamento de jabuticabeira (*Plinia trunciflora*) por mergulhia aérea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 530-532, 2006.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; AMBRÓSIO, R.; WAGNER JÚNIOR, A. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 246-252, 2011.

DE-LA-PEÑA, C.; NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; AVILEZ-MONTALVO, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 635, 2015.

DICKISON, W. C. **Integrative Plant Anatomy**. San Diego: Academic Press, 2000.

DOBROWOLSKA, I.; ANDRADE, G. M.; CLAPHAM, D.; EGERTSDOTTER, U. Histological analysis reveals the formation of shoots rather than embryos in regenerating cultures of *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 2, p. 319-326, 2017.

DUARTE, O.; PAULL, R. E. Myrtaceae. *In*: DUARTE, O.; PAULL, R. E (Eds.). **Exotic fruits and nuts of the new world**. CABI Publishing, 2015. p. 51-95.

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes in 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 157-162, 1993.

EUI, C. Y.; SOH, W. Y. Effect of ammonium ion on morphogenesis from cultured cotyledon explants of *Panax ginseng*. **Journal of Plant Biology**, v. 40, n.1, p. 21-26, 1997.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? *In*: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (Eds.) **Somatic embryogenesis**, vol. 2, Plant cell monographs. Heidelberg: Springer, 2005. p. 85-101.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G. A.; SPUDEIT, D. A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 2165-2176, 2012.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.

GALLEGO RÚA, A. M.; HENAO RAMÍREZ, A. M.; URREA TRUJILLO, A. I.; ATEHORTÚA GARCÉS, L. Polyphenols distribution and reserve substances analysis in cocoa somatic embryogenesis. **Acta Biológica Colombiana**, v. 21, n. 2, p. 335-345, 2016.

GEORGE, E. F.; DE KLERK, G. J. The components of plant culture media I: macro and micro-nutrients. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, v. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 65-114.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v. 18, p. 115-135, 2004.

GUAN, Y.; LI, S. G.; FAN, X. F.; SU, Z. H. Application of somatic embryogenesis in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 938, p. 1-12, 2016.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; DOS REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.

GUERRA, M. P.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; CAPRESTANO, C. A. Micropropagation systems in Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret). *In*: LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; JAIN, S. M. (Eds.) **Protocols for micropropagation of select economically-important horticultural plants**. New York: Humana Press, 2013. p. 45-62.

GUTIÉRREZ-MORA, A.; GONZÁLEZ-GUTIÉRREZ, A. G.; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; ASCENCIO-CABRAL, A. LI-WEI, L. Plant somatic embryogenesis: some useful considerations. *In*: SATO, K. (Ed.), **Embryogenesis**. InTech, 2012. p. 229-248.

HALPERIN, W. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. **American Journal of Botany**, v. 53, n. 5, p. 443-453, 1966.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v. 79, p. 45-58, 1994.

HIGASHI, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 109-114, 1996.

HOLOBIUC, I. Somatic embryogenesis in long-term cultures of *Gentiana lutea* L. in the presence of osmotic stress. *In*: RYBCZYNSKI, J. J.; DAVEY, M. R.; MIKULA, A. (Eds.). **The Gentianaceae – volume 2: Biotechnology and applications**. Springer: Berlin Heidelberg, 2015. p. 139-162.

HÖSSEL, C.; OLIVEIRA, J. S. M. A.; FABIANE, K. C.; WAGNER JÚNIOR, A.; CITADIN, I. Conservação e teste de tetrazólio em sementes de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 255-261, 2013.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, p. 1-22, 2016.

JALALI, M. A.; SIRMANDI, H. B.; HATAMZADEH, A. Effects of carbohydrate source and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos in walnut (*Juglans regia* L.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 29-35, 2017.

JOHANSSON, L. B.; CALLEBERG, E.; GEDIN, A. Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis*. **Physiologia Plantarum**, v. 80, p. 243-249, 1990.

JOSHI, R.; KUMAR, P. Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. **Agricultural Reviews**, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2013.

KANG, H. D.; MOON, H. K.; LEE, S. K. Micropropagation via somatic embryogenesis of rare and endangered species, *Acanthopanax seoulenses* Nakai. **Forest Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 190-196, 2014.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KHLIFI, S.; TREMBLAY, F. M. Maturation of black spruce somatic embryos. Part I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, p. 23-32, 1995.

KOUAKOU, T. H.; WAFFO-TÉGUO, P.; KOUADIO, Y. J.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DECENDIT, A.; MÉRILLON, J. M. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 25-29, 2007.

KOUASSI, M. K.; MANLÉ, E. T.; DAOUDA, K.; BRAHIMA S. A.; TCHOA, K.; KOUABLAN, K. E.; MONGOMAKÉ, K. Effect of antioxidants on the callus induction and the development of somatic embryogenesis of cocoa [*Theobroma cacao* (L.)]. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 1, p. 25-31, 2017.

KUMAR, V.; VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 194, p. 1-17, 2017.

LANDRUM, L. R. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinum* and *Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica Monograph**, v. 45, p. 1-178, 1986.

LINOSSIER, L.; VEISSEIRE, P.; CAILLOUX, F.; COUDRET, A. Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. **Plant Science**, v. 124, p. 183-191, 1997.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 416-425 1995.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOSCHIAVO, F.; PITTO, L.; GIULIANO, G.; TORTI, G.; NUTI-RONCHI, V.; MARAZZITI, D.; VERGARA, R.; ORSELLI, S.; TERZI, M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 325-331, 1989.

MERKLE, S. A.; DEAN, J. F. D. Forest tree biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 298-302, 2000.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Springer Science, 1995. p. 155-204.

MICHAUX-FERRIÈRE, N; SCHWENDIMAN, J. Histology of somatic embryogenesis. In: DATTÉE, Y.; DUMAS, C.; GALLAIS, A. (Eds.). **Reproductive biology and plant breeding: Biologie de la Reproduction et Amélioration des Plantes**. Springer: Berlin, 1992. p. 247-260.

MISRA, S.; ATTREE, S. M.; LEAL, I.; FOWKE, L. C. Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. **Annals of Botany**, v. 71, p. 11-22, 1993.

MITRA, G. C.; CHATURVEDI, H. C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo*-grown emasculated flower buds of *Citrus* spp. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 99, n. 4, p. 184-189, 1972.

MOREL, G.; WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 138-140, 1951.

MOSHKOV, I. E.; NOVIKOVA, G. V.; HALL, M. A.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; Miscellaneous compounds. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 227-282.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guava tree cv. Paluma. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 507-511, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NIC-CAN, G. I.; AVILEZ-MONTALVO, J. R.; AVILES-MONTALVO, R. N.; MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E.; MELLADO-MOJICA, E.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The relationship between stress and somatic embryogenesis. *In*: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEIO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: fundamental aspects and applications**. Springer Press, 2016. p. 151-170.

NIC-CAN, G. I.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. *In*: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: fundamental aspects and applications**. Switzerland: Springer Press, 2016. p. 171-182.

NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. *In*: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Springer Science, 1995. p. 249-266.

OGITA, S.; SASAMOTO, H.; YEUNG, E. C.; THORPE, T. A. The effects of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptomeria japonica*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 37, p. 268-273, 2001.

ORINOS, T.; MITRAKOS, K. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr) mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, p. 183-187, 1991.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155-163, 1998.

PARROTT, W. A. Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 17-21, 1991.

- PARROTT, W. A.; DRYDEN, G.; VOGT, S.; HILDEBRAND, D. F.; COLLINS, G. B.; WILLIAMS, E. G. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 24, n. 8, 1988.
- PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. in vitro. **Z. Pflanzenphysiol. Bd.**, v. 98, p. 1-14, 1980.
- PENCE, V. C. Abscisic acid and the maturation of cacao embryos *in vitro*. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1391-1395, 1992.
- PEREIRA, M.; OLIVEIRA, A. L.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Efeitos de substratos, valores de pH, concentrações de AIB no enraizamento de estacas apicais de jabuticabeira [*Myrciaria jabuticaba* (Vell.) O. Berg.]. **Scientia Forestalis**, v. 69, p. 84-92, 2005.
- PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.
- PESCADOR, G. B.; KERBAUY, G. B.; FRAGA, H. P. F.; HAMASAKI, R. M.; TAVARES, L. B. B.; GUERRA, M. P. Dynamics of free and 3H-labelled glutamine concentrations during zygotic and somatic embryogenesis of Feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret]. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 87, n. 6, p. 583-587, 2012.
- PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; ENDRES, L.; FRAGA, H. P. F.; GUERRA, M. P. Synthesis and accumulation of free amino acids during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 22, p. 3455-3465, 2013.
- PUIGDERRAJOLS, P.; CELESTINO, C.; SUILS, M.; TORIBIO, M.; MOLINAS, M. Histology of organogenic and embryogenic responses in cotyledons of somatic embryos of *Quercus suber* L. **International Journal of Plant Sciences**, v. 161, n. 3, p. 353-362, 2000.
- QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOVOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant propagation by tissue culture**, v. 86, p. 285-301, 2006.
- RAI, M. K.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 129-133, 2007.
- REIS, E.; BATISTA, M. T.; CANHOTO, J. M. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma**, v. 232, p. 193-202, 2008.

ROCHA, D. I.; KURCZYNSKA, E.; POTOCKA, I.; STEINMACHER, D. A.; OTONI, W. C. Histology and histochemistry of somatic embryogenesis. *In*: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEIO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis**: fundamental aspects and applications. Springer Press, 2016. p. 471-494.

RUDIYANTO; EFENDI, D.; ERMAYANTI, T. M. Somatic embryo germination of *Jatropha curcas* L in presence of sucrose and poly ethylene glycol (PEG). **Annales Bogorienses**, v. 18, n. 1, p. 35-43, 2014.

SAAD, A. I. M.; ELSHAED, A. M. Plant tissue culture media. *In*: LEVA, A.; RINALDI, L. M. R. (Eds.). **Recent advances in plant in vitro culture**. Intech, 2012. p. 29-40.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; SILVA, L. C.; AZEVEDO, A. A.; AGUIAR, R. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 313-321, 2006.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A.; ALVES, T. G.; CAMPOS, N. V.; OLIVA, M. A.; VALENTE, V. M. M. Effects of emissions from and aluminium smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225: 1817, 2014.

SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jaboticabeira por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 577-583, 2010.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assisat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SOARES-SILVA, L. H. **A família Myrtaceae - subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil**. 478 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae *In* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB37142>).

SOUZA-MOREIRA, T. M.; MOREIRA, R. D.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 48-53, 2008.

STASOLLA, C.; ZYL, L. V.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R. R. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. **Plant Physiology**, v. 131, p. 49-60, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

THOLAKALABAVI, A.; ZWIAZEK, J. J.; THORPE, T. A. Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoids* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 30, p. 164-170, 1994.

TUFFI-SANTOS, L. D.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A.; TIBURCIO, R. A. S.; MACHADO, A. F. L. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 1, 2009.

TYAGI, A. K.; RASHID, A.; MAHESHWARI, S. C. Promotive effect of polyvinylpyrrolidone on pollen embryogenesis in *Datura innoxia*. **Physiologia Plantarum**, v. 53, p. 405-406, 1981.

VALIO, I. F. M.; FERREIRA, Z. Germination of seeds of *Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 2, p. 95-98, 1992.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 870-874, 1981.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J.; HENSHAW, G. G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 89, p. 141-147, 1978.

WETHERELL, D. F.; DOUGALL, D. K. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. **Physiologia Plantarum**, v. 37, p. 97-103, 1976.

WOO, S. M.; WETZSTEIN, H. Y. Morphological and histological evaluations of *in vitro* regeneration in *Elliottia racemosa* leaf explants induced on media with thidiazuron. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, n. 2, p. 167-172, 2008.

WU, S. B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7513-7525, 2012.

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, p. 148-159, 2013.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 29, p. 36-57, 2010.

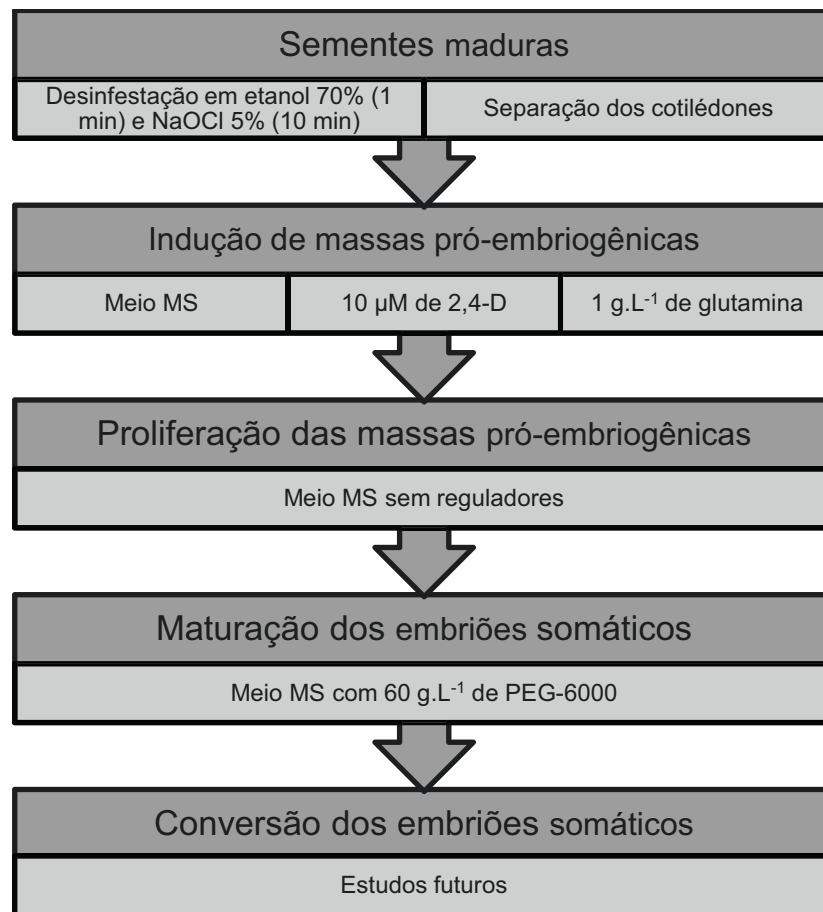
ZHOU, B.; WEI, X.; WANG, R.; JIA, J. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, n. 3, p. 109-116, 2010.

ZHOU, S.; BROWN, D. C. W. High efficiency plant production of North American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 166-173, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível iniciar a calogênese *in vitro* de jabuticabeira a partir de discos foliares de plântulas jovens, porém não foi verificada capacidade embriogênica nos tratamentos testados. Por outro lado, a indução de embriões somáticos em jabuticabeira é possível utilizando sementes maduras como fonte de explantes.

PROTOCOLO PROPOSTO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA PARA JABUTICABEIRA (*Plinia peruviana*) E CONDIÇÕES DE CULTURA EM CADA ETAPA



O uso da auxina 2,4-D é importante para a indução de massas pró-embriogênicas. Porém, as análises histológicas confirmaram os efeitos negativos deste regulador quando aplicado por longo período, com a formação de tecido de cicatrização no interior dos embriões somáticos, levando ao impedimento de sua posterior conversão em plântulas.

Recomenda-se a realização de novos estudos utilizando tratamento com pulso de 2,4-D, ou períodos de exposição menores do que 7 dias, para a indução de massas pró-embriogênicas de jabuticabeira. A partir disso, é importante determinar um período de exposição mínimo para desencadear as respostas embriogênicas sem resultar em embriões somáticos anormais.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1679-1687, 2012.
- AKHTAR, N. Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 556-562, 2010.
- AKHTAR, N. Somatic embryogenesis for efficient micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) In: LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; JAIN, S. M. (Eds.) **Protocols for micropropagation of select economically-important horticultural plants**. New York: Humana Press, 2013. p. 161-177.
- ALEXANDRE, R. S.; WAGNER JÚNIOR, A.; NEGREIROS, J. R. S.; BRUCKER, C. H. Estádio de maturação dos frutos e substratos na germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 2, p. 227-230, 2006.
- AL-KHAYRI, J. M.; Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant)**, v. 37, p. 453-456, 2001.
- ALMEIDA-TEIXEIRA, G. H.; BERLINGIERI DURIGAN, M. F.; DURIGAN, J. F. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. [Myrtaceae]). In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits**. New Dehli: Woodhead Publishing, 2011. p. 246-274.
- ASAD, S.; ARSHAD, M.; MANSOOR, S.; ZAFAR, Y. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1214-1218, 2009.
- ATTREE, S. M.; FOWKE, L. C. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 1-35, 1993.
- AZOIFEFA, A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. **Agrociencia Mesoamericana**, v. 20, n. 1, p. 153-175, 2009.
- BAJPAI, A.; KALIM, S.; CHANDRA, R.; KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-12, 2016.
- BARROS, R. S.; FINGER, F. L.; MAGALHÃES, M. M. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v. 66, p. 209-215, 1996.

- BENELLI, C.; GERMANÀ, M. A.; GANINO, T.; BEGHE, D.; FABBRI, A. Morphological and anatomical observations of abnormal somatic embryos from anther cultures of *Citrus reticulata*. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 224-230, 2010.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HIHLHORST, H. W. M; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3ed. New York: Springer, 2013.
- BOREK, S.; PUKACKA, S.; MICHALSKI, K. Regulation by sucrose of storage compounds breakdown in germinating seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.), white lupine (*Lupinus albus* L.) and Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet.) II. Mobilization of storage lipid. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 1199-1206, 2012.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014.
- CALLONI, C.; AGNOL, R. D.; MARTÍNEZ, L. S.; MARCON, F. S.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International**, v. 70, p. 15-22, 2015.
- CANGAHUALA-INOCENTE, C. G.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 87-89, 2007a.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; STEINMACHER, D.; TORRES, A. C.; GUERRA, M. P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret): Induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 228-234, 2007b.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C. A.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** (Plant), v. 50, p. 166-175, 2014.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33-40, 2004.
- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. *Feijoa sellowiana* Berg (pineapple guava). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry 35. Trees IV**. New Delhi: Springer, 1996a. p. 155-171.
- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). **Protoplasma**, v. 191, p. 34-45, 1996b.

- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. **In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant)**, v. 30, n. 1, p. 21-25, 1994.
- CANHOTO, J. M.; LOPES, M. L.; CRUZ, G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 13-21, 1999.
- CANHOTO, J. M.; MESQUITA, J. F.; CRUZ, G. S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (Myrtaceae) during somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 78, p. 513-521, 1996.
- CARLSSON, J.; SVENNERSTAM, H.; MORITZ, T.; EGERTSDOTTER, U.; GANETEG, U. Nitrogen uptake and assimilation in proliferating embryogenic cultures of Norway spruce – Investigating the specific role of glutamine. **Plos One**, v. 12, n. 8, 2017.
- CASSOL, D. A.; WAGNER JÚNIOR, A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I. Embalagem, época e ácido indolbutírico na propagação de jaboticabeira por alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 267-272, 2015.
- CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticaba trees (*Plinia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343, 2010.
- CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; IBARRA, M.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoots cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* x *E. maidenii* trees. **Tree Physiology**, v. 35, n. 6, p. 378-390, 2015.
- CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. **Annals of Botany**, v. 92, p. 129-136, 2003.
- CORREDOIRA, E.; SAN-JOSÉ, M. C.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* trees. **Trees**, v. 26, p. 881-891, 2012.
- CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; VIEITEZ, A. M. Morphological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant)**, v. 42, p. 525-533, 2006.
- CRUZ, G. S.; CANHOTO, J. M.; ABREU, M. A. V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science**, v. 66, p. 263-270, 1990.
- DAL VESCO, L. L. **Indução e controle da embriogênese somática in vitro na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg)**. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 1998.

- DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JÚNIOR, A. A.; ASSMANN, A. P.; MAZARO, S. M.; DONAZZOLO, J.; SASSO, S. A. Z. Enraizamento de jaboticabeira (*Plinia trunciflora*) por mergulhia aérea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 530-532, 2006.
- DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; AMBRÓSIO, R.; WAGNER JÚNIOR, A. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 246-252, 2011.
- DE SMET, I.; LAU, S.; MAYER, U.; JÜRGENS, G. Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. **The Plant Journal**, v. 61, p. 959-970, 2010.
- DE-LA-PEÑA, C.; NIC-CAN, G. I.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; AVILEZ-MONTALVO, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 635, 2015.
- DICKISON, W. C. **Integrative Plant Anatomy**. San Diego: Academic Press, 2000.
- DOBROWOLSKA, I.; ANDRADE, G. M.; CLAPHAM, D.; EGERTSDOTTER, U. Histological analysis reveals the formation of shoots rather than embryos in regenerating cultures of *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 2, p. 319-326, 2017.
- DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G. KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 313, p. 1493-1509, 1997.
- DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; GUIMARÃES, R. M.; LARA, T. S.; CUSTÓDIO, T. N.; CHAVES, I. S. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1362-1368, 2011.
- DUARTE, O.; PAULL, R. E. Myrtaceae. In: DUARTE, O.; PAULL, R. E (Eds.). **Exotic fruits and nuts of the new world**. CABI Publishing, 2015. p. 51-95.
- DUNSTAN, D. I.; TAUTORUS, T. E.; THORPE, T. A. Somatic embryogenesis in woody plants. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Springer Science, 1995. p. 471-540.
- EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes in 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 157-162, 1993.
- EUI, C. Y.; SOH, W. Y. Effect of ammonium ion on morphogenesis from cultured cotyledon explants of *Panax ginseng*. **Journal of Plant Biology**, v. 40, n.1, p. 21-26, 1997.
- FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, A.; SAMAJ, J. (Eds.) **Somatic embryogenesis**, vol. 2, Plant cell monographs. Heidelberg: Springer, 2005. p. 85-101.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G. A.; SPUDEIT, D. A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 2165-2176, 2012.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious Regeneration. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, v. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 355-402.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.

GALLEGO RÚA, A. M.; HENAO RAMÍREZ, A. M.; URREA TRUJILLO, A. I.; ATEHORTÚA GARCÉS, L. Polyphenols distribution and reserve substances analysis in cocoa somatic embryogenesis. **Acta Biológica Colombiana**, v. 21, n. 2, p. 335-345, 2016.

GEORGE, E. F. DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, v. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.

GEORGE, E. F.; DE KLERK, G. J. The components of plant culture media I: macro and micro-nutrients. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, v. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 65-114.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v. 18, p. 115-135, 2004.

GUAN, Y.; LI, S. G.; FAN, X. F.; SU, Z. H. Application of somatic embryogenesis in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 938, p. 1-12, 2016.

GUERRA, M. P.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; CAPRESTANO, C. A. Micropropagation systems in Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret). *In*: LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; JAIN, S. M. (Eds.) **Protocols for micropropagation of select economically-important horticultural plants**. New York: Humana Press, 2013. p. 45-62.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; DOS REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.

GUTIÉRREZ-MORA, A.; GONZÁLEZ-GUTIÉRREZ, A. G.; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; ASCENCIO-CABRAL, A. LI-WEI, L. Plant somatic embryogenesis: some useful considerations. *In*: SATO, K. (Ed.), **Embryogenesis**. InTech, 2012. p. 229-248.

HALPERIN, W. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. **American Journal of Botany**, v. 53, n. 5, p. 443-453, 1966.

HENRY, Y.; VAIN, P.; DE BUYSER, J. Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, v. 79, p. 45-58, 1994.

HIGASHI, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 109-114, 1996.

HOLOBIUC, I. Somatic embryogenesis in long-term cultures of *Gentiana lutea* L. in the presence of osmotic stress. *In*: RYBCZYNSKI, J. J.; DAVEY, M. R.; MIKULA, A. (Eds.). **The Gentianaceae – volume 2: Biotechnology and applications**. Springer: Berlin Heidelberg, 2015. p. 139-162.

HÖSSEL, C.; OLIVEIRA, J. S. M. A.; FABIANE, K. C.; WAGNER JÚNIOR, A.; CITADIN, I. Conservação e teste de tetrazólio em sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 255-261, 2013.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, p. 1-22, 2016.

JALALI, M. A.; SIRMANDI, H. B.; HATAMZADEH, A. Effects of carbohydrate source and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos in walnut (*Juglans regia* L.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 29-35, 2017.

JOHANSSON, L. B.; CALLEBERG, E.; GEDIN, A. Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis*. **Physiologia Plantarum**, v. 80, p. 243-249, 1990.

JOSHI, R.; KUMAR, P. Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. **Agricultural Reviews**, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2013.

KAHIA, J.; KIRIKA, M.; LUBABALI, H.; MANTELL, S. High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaves derived from in vitro-germinated seedlings of a *Coffea arabica* hybrid cultivar. **HortScience**, v. 51, n. 9, p. 1148-1152, 2016.

KANG, H. D.; MOON, H. K.; LEE, S. K. Micropropagation via somatic embryogenesis of rare and endangered species, *Acanthopanax seoulenses* Nakai. **Forest Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 190-196, 2014.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KHLIFI, S.; TREMBLAY, F. M. Maturation of black spruce somatic embryos. Part I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, p. 23-32, 1995.

KOUAKOU, T. H.; WAFFO-TÉGUO, P.; KOUADIO, Y. J.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DECENDIT, A.; MÉRILLON, J. M. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 25-29, 2007.

KOUASSI, M. K.; MANLÉ, E. T.; DAOUDA, K.; BRAHIMA S. A.; TCHOA, K.; KOUABLAN, K. E.; MONGOMAKÉ, K. Effect of antioxidants on the callus induction and the development of somatic embryogenesis of cocoa [*Theobroma cacao* (L.)]. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 1, p. 25-31, 2017.

KUMAR, V.; VAN STADEN, J. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 194, p. 1-17, 2017.

LAN, T. H.; HONG, P. I.; HUANG, C. C.; CHANG, W. C.; LIN, C. S. High-frequency direct somatic embryogenesis from leaf tissue of *Drimiopsis kirkii* Baker (giant squill). **In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant)**, v. 45, p. 44-47, 2009.

LANDRUM, L. R. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinum* and *Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica Monograph**, v. 45, p. 1-178, 1986.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, n.4, p. 508-536, 1997.

LINOSSIER, L.; VEISSEIRE, P.; CAILLOUX, F.; COUDRET, A. Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. **Plant Science**, v. 124, p. 183-191, 1997.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 416-425 1995.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOSCHIAVO, F.; PITTO, L.; GIULIANO, G.; TORTI, G.; NUTI-RONCHI, V.; MARAZZITI, D.; VERGARA, R.; ORSELLI, S.; TERZI, M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 325-331, 1989.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MERKLE, S. A.; DEAN, J. F. D. Forest tree biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 298-302, 2000.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. *In*: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Springer Science, 1995. p. 155-204.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; SCHWENDIMAN, J. Histology of somatic embryogenesis. In: DATTÉE, Y.; DUMAS, C.; GALLAIS, A. (Eds.). **Reproductive biology and plant breeding**: Biologie de la Reproduction et Amélioration des Plantes. Springer: Berlin, 1992. p. 247-260.

MISRA, S.; ATTREE, S. M.; LEAL, I.; FOWKE, L. C. Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. **Annals of Botany**, v. 71, p. 11-22, 1993.

MITRA, G. C.; CHATURVEDI, H. C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo*-grown emasculated flower buds of *Citrus* spp. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 99, n. 4, p. 184-189, 1972.

MÖLLER, B.; WEIJERS, D. Auxin control of embryo patterning. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, 2009.

MOREL, G.; WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 138-140, 1951.

MOSHKOV, I. E.; NOVIKOVA, G. V.; HALL, M. A.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; Miscellaneous compounds. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 227-282.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 75-81, 2007.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guava tree cv. Paluma. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 507-511, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAKANO, M.; KIGOSHI, K.; SHIMIZU, T.; ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H. OMURA, M. Characterization of genes associated with polyembryony and *in vitro* somatic embryogenesis in *Citrus*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, p. 795-803, 2013.

NIC-CAN, G. I.; AVILEZ-MONTALVO, J. R.; AVILES-MONTALVO, R. N.; MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E.; MELLADO-MOJICA, E.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The relationship between stress and somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis**: fundamental aspects and applications. Springer Press, 2016. p. 151-170.

NIC-CAN, G. I.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic**

Embryogenesis: fundamental aspects and applications. Switzerland: Springer Press, 2016. p. 171-182.

NOLAN, K. E.; ROSE, R. J. Plant regeneration – somatic embryogenesis. *In*: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture**. Wiley-Blackwell, 2010. p. 39-60.

NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. *In*: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Springer Science, 1995. p. 249-266.

OGITA, S.; SASAMOTO, H.; YEUNG, E. C.; THORPE, T. A. The effects of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptomeria japonica*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 37, p. 268-273, 2001.

ORINOS, T.; MITRAKOS, K. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr) mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, p. 183-187, 1991.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155-163, 1998.

PARROTT, W. A. Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 17-21, 1991.

PARROTT, W. A.; DRYDEN, G.; VOGT, S.; HILDEBRAND, D. F.; COLLINS, G. B.; WILLIAMS, E. G. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 24, n. 8, 1988.

PENCE, V. C. Abscisic acid and the maturation of cacao embryos *in vitro*. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1391-1395, 1992.

PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. *in vitro*. **Z. Pflanzenphysiol. Bd.**, v. 98, p. 1-14, 1980.

PEREIRA, M.; OLIVEIRA, A. L.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Efeitos de substratos, valores de pH, concentrações de AIB no enraizamento de estacas apicais de jabuticabeira [*Myrciaria jabuticaba* (Vell.) O. Berg.]. **Scientia Forestalis**, v. 69, p. 84-92, 2005.

PESCADOR, G. B.; KERBAUY, G. B.; FRAGA, H. P. F.; HAMASAKI, R. M.; TAVARES, L. B. B.; GUERRA, M. P. Dynamics of free and 3H-labelled glutamine concentrations during zygotic and somatic embryogenesis of Feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret]. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 87, n. 6, p. 583-587, 2012.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; ENDRES, L.; FRAGA, H. P. F.; GUERRA, M. P. Synthesis and accumulation of free amino acids during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 22, p. 3455-3465, 2013.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: Agiplan, 1985.

PUIGDERRAJOLS, P.; CELESTINO, C.; SUILS, M.; TORIBIO, M.; MOLINAS, M. Histology of organogenic and embryogenic responses in cotyledons of somatic embryos of *Quercus suber* L. **International Journal of Plant Sciences**, v. 161, n. 3, p. 353-362, 2000.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006.

RAI, M. K.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 129-133, 2007.

RAMOS, R. S.; MELO, E. F.; MELO, C. G.; RODRIGUES, C. R.; VIEIRA, M. S.; BARBOSA, M. H. P. The use of histological analysis for the detection of somatic embryos in sugarcane. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 762-767, 2014.

RANCILLAC, M.; KLINGUER, A.; KLINGUER, S.; MILLET, B. Preliminary investigations on somatic embryogenesis from leaf discs of red oak (*Quercus rubra* L.). **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 67-73, 1996.

REIS, E.; BATISTA, M. T.; CANHOTO, J. M. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma**, v. 232, p. 193-202, 2008.

ROCHA, D. I.; KURCZYNSKA, E.; POTOCKA, I.; STEINMACHER, D. A.; OTONI, W. C. Histology and histochemistry of somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis**: fundamental aspects and applications. Switzerland: Springer Press, 2016. p. 471-494.

RUDIYANTO; EFENDI, D.; ERMAYANTI, T. M. Somatic embryo germination of *Jatropha curcas* L in presence of sucrose and poly ethylene glycol (PEG). **Annales Bogorienses**, v. 18, n. 1, p. 35-43, 2014.

SAAD, A. I. M.; ELSHAED, A. M. Plant tissue culture media. In: LEVA, A.; RINALDI, L. M. R. (Eds.). **Recent advances in plant in vitro culture**. Intech, 2012. p. 29-40.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A.; ALVES, T. G.; CAMPOS, N. V.; OLIVA, M. A.; VALENTE, V. M. M. Effects of emissions from and aluminium smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225: 1817, 2014.

- SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; SILVA, L. C.; AZEVEDO, A. A.; AGUIAR, R. Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 313-321, 2006.
- SANTOS, C. M. R.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 2, p. 13-20, 2004.
- SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jaboticabeira por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 577-583, 2010.
- SHANG, H.; LIU, C.; ZHANG, C.; LI, F.; HONG, W.; LI, F. Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between Agrobacterium transformed embryogenic and non-embryogenic calli of cotton. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, n. 5, p. 456-465, 2009.
- SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.
- SILVEIRA, V.; VITA, A. M.; MACEDO, A. F.; DIAS, M. F. R.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 114, p. 351-364, 2013.
- SOARES-SILVA, L. H. **A família Myrtaceae - subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil**. 478 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae *In* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB37142>).
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2ª ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2008.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; MOREIRA, R. D.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 48-53, 2008.
- STASOLLA, C.; ZYL, L. V.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R. R. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. **Plant Physiology**, v. 131, p. 49-60, 2003.

STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 117-126, 2005.

SUGAHARA, V. Y.; TAKAKI, M. Effect of light and temperature on seed germination in guava (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae). **Seed Science and Technology**, v. 32, p. 759-764, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

THOLAKALABAVI, A.; ZWIAZEK, J. J.; THORPE, T. A. Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoids* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 30, p. 164-170, 1994.

TUFFI-SANTOS, L. D.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A.; TIBURCIO, R. A. S.; MACHADO, A. F. L. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 1, 2009.

TYAGI, A. K.; RASHID, A.; MAHESHWARI, S. C. Promotive effect of polyvinylpyrrolidone on pollen embryogenesis in *Datura innoxia*. **Physiologia Plantarum**, v. 53, p. 405-406, 1981.

VALIO, I. F. M.; FERREIRA, Z. Germination of seeds of *Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 2, p. 95-98, 1992.

VON ARNOLD, S. Somatic embryogenesis *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 335-354.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 870-874, 1981.

WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J.; HENSHAW, G. G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 89, p. 141-147, 1978.

WELANDER, M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees. **Journal of Plant Physiology**, v. 132, p. 738-744, 1988.

WETHERELL, D. F.; DOUGALL, D. K. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. **Physiologia Plantarum**, v. 37, p. 97-103, 1976.

WOO, S. M.; WETZSTEIN, H. Y. Morphological and histological evaluations of in vitro regeneration in *Elliottia racemosa* leaf explants induced on media with thidiazuron. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, n. 2, p. 167-172, 2008.

WU, S. B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7513-7525, 2012.

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, p. 148-159, 2013.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 29, p. 36-57, 2010.

YEUNG, E. C. The use of histology in the study of plant tissue culture systems - some practical comments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology (Plant)**, v. 35, p. 137-143, 1999.

ZHOU, B.; WEI, X.; WANG, R.; JIA, J. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, n. 3, p. 109-116, 2010.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.

ANEXO 1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS MS E LPM

NUTRIENTE	CONCENTRAÇÃO NO MEIO DE CULTURA (mg.L ⁻¹)	
	MEIO MS	MEIO LPM
NH ₄ NO ₃	1650	1200
KNO ₃	1900	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	180
KH ₂ PO ₄	170	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
H ₃ BO ₃	6,2	0,63
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0025
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	2,2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	-
Zn-EDTA	-	4,05
KI	0,83	0,75
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	14,0
Na ₂ EDTA	37,3	19,0

MS - Meio desenvolvido para calos de tabaco por Murashige e Skoog (1962); LPM - Meio de cultura de protoplastos de folhas de ervilha modificado por Von Arnold e Eriksson (1981)

ANEXO 2 - COMPOSIÇÃO DE VITAMINAS DOS MEIOS MS E DE MOREL E WETMORE

VITAMINAS	CONCENTRAÇÃO NO MEIO DE CULTURA (mg.L ⁻¹)	
	Vitaminas MS	Vitaminas M&W
Mio-inositol	100	100
Piridoxina HCl	0,5	1
Tiamina HCl	0,1	1
Ácido nicotínico	0,5	1
Glicina	2	-
Biotina	-	0,01
Pantotenato de cálcio	-	1

MS - Vitaminas descritas por Murashige e Skoog (1962); M&W – Vitaminas descritas por Morel e Wetmore (1951)

ANEXO 3 - RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA (ANOVA)

ANEXO 3.1 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “contaminação”, na germinação *in vitro* de sementes de jabuticabeira

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Meio de cultura	1	0,00000	0,00000	0,0000 **
Presença de sacarose	1	0,37556	0,37556	18,8393 **
Interação F1xF2	1	0,02000	0,02000	1,0033 ns
Tratamentos	3	0,39556	0,13185	6,6142 **
Resíduo	68	1,35556	0,01993	
Total	71	1,75111		
Coeficiente de variação			127,07%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.2 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de germinação”, na germinação *in vitro* de sementes de jabuticabeira

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Meio de cultura	1	0,02000	0,02000	0,4629 ns
Presença de sacarose	1	2,00000	2,00000	46,2935**
Interação F1xF2	1	0,00000	0,00000	0,0000 ns
Tratamentos	3	2,02000	0,67333	15,5855 **
Resíduo	68	2,93778	0,04320	
Total	71	4,95778		
Coeficiente de variação			42,04%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.3 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de calos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de discos foliares

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Regulador	1	0,56719	0,56719	9,2910 **
Concentração de regulador	2	0,10729	0,05365	0,8788 ns
Interação F1xF2	2	0,41563	0,20781	3,4041 *
Tratamentos	5	1,09010	0,21802	3,5714 **
Resíduo	114	6,95938	0,06105	
Total	119	8,04948		
Coeficiente de variação			103,13%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.4 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de calos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de discos foliares

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Concentração de regulador	3	0,41243	0,13748	1,2633 ns
Posição da folha	1	1,29199	1,29199	11,8724 **
Interação F1xF2	3	0,90202	0,30067	2,7630 *
Tratamentos	7	2,60645	0,37235	3,4216 **
Resíduo	184	20,02344	0,10882	
Total	191	22,62988		
Coeficiente de variação			57,45%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.5 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de calos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Meio de cultura	1	0,00000	0,00000	0,0000 ns
Vitaminas	1	0,01143	0,01143	0,0945 ns
Interação F1xF2	1	0,07143	0,07143	0,5904 ns
Tratamentos	3	0,08286	0,02762	0,2283 ns
Resíduo	52	6,29143	0,12099	
Total	55	6,37429		
Coeficiente de variação			60,12%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.6 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Meio de cultura	1	0,04571	0,04571	0,8438 ns
Vitaminas	1	0,00286	0,00286	0,0527 ns
Interação F1xF2	1	0,01143	0,01143	0,2110 ns
Tratamentos	3	0,06000	0,02000	0,3692 ns
Resíduo	52	2,81714	0,05418	
Total	55	2,87714		
Coeficiente de variação			112,37%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.7 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de massas contendo embriões somáticos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Meio de cultura	1	0,08643	0,08643	5,0256 *
Vitaminas	1	0,00071	0,00071	0,0415 ns
Interação F1xF2	1	0,12071	0,12071	7,0192 *
Tratamentos	3	0,20786	0,06929	
Resíduo	52	0,89429	0,01720	
Total	55	1,10214		
Coeficiente de variação			159,65%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.8 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de calos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Concentração de 2,4-D	1	0,00000	0,00000	0,0000 ns
Fonte de nitrogênio	2	0,00521	0,00260	0,4615 ns
Interação F1xF2	2	0,01563	0,00781	1,3846 ns
Tratamentos	5	0,02083	0,00417	0,7385 ns
Resíduo	30	0,10156	0,00564	
Total	35	0,12240		
Coeficiente de variação			7,92%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.9 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Concentração de 2,4-D	1	0,03190	0,03190	1,3738 ns
Fonte de nitrogênio	2	0,30859	0,15430	6,6449**
Interação F1xF2	2	0,09505	0,04753	2,0467 ns
Tratamentos	5	0,43555	0,08711	3,7514*
Resíduo	30	0,41797	0,02322	
Total	35	0,85352		
Coeficiente de variação			31,4%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.10 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de massas contendo embriões somáticos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Concentração de 2,4-D	1	0,00065	0,00065	0,0361 ns
Fonte de nitrogênio	2	0,42578	0,21289	11,8193 **
Interação F1xF2	2	0,35286	0,17643	9,7952 **
Tratamentos	5	0,77930	0,15586	8,6530 **
Resíduo	30	0,32422	0,01801	
Total	35	1,10352		
Coeficiente de variação			34,36%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.11 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de calos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes, na presença de carvão ativado

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Concentração de 2,4-D	1	0,16900	0,16900	2,3014 ns
Fonte de nitrogênio	3	0,10353	0,03451	0,4699 ns
Interação F1xF2	3	0,30138	0,10046	1,3680 ns
Tratamentos	7	0,57391	0,08199	1,1165 ns
Resíduo	32	2,34988	0,07343	
Total	39	2,92379		

Coeficiente de variação 96,61%

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.12 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes, na presença de carvão ativado

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Concentração de 2,4-D	1	0,00020	0,00020	0,0066 ns
Fonte de nitrogênio	3	0,25245	0,08415	2,7358 ns
Interação F1xF2	3	0,01245	0,00415	0,1349 ns
Tratamentos	7	0,26510	0,03787	1,2312 ns
Resíduo	32	0,98428	0,03076	
Total	39	1,24938		

Coeficiente de variação 148,31%

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.13 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de massas contendo embriões somáticos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, na presença de carvão ativado

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Concentração de 2,4-D	1	0,00072	0,00072	0,0280 ns
Fonte de nitrogênio	3	0,15501	0,05167	2,0054 ns
Interação F1xF2	3	0,00873	0,00291	0,1129 ns
Tratamentos	7	0,16446	0,02349	0,9119 ns
Resíduo	32	0,82448	0,02577	
Total	39	0,98894		

Coeficiente de variação 154,71%

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.14 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de calos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de glutamina

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,23250	0,05813	1,4235 ns
Resíduo	45	1,83750	0,04083	
Total	49	2,0700		

Coeficiente de variação 24,95%

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.15 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de glutamina

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,69250	0,17313	3,6770 *
Resíduo	45	2,11875	0,04708	
Total	49	2,81125		
Coeficiente de variação			85,09%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.16 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de massas contendo embriões somáticos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de glutamina

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,38750	0,09688	3,5227 *
Resíduo	45	1,23750	0,02750	
Total	49	1,62500		
Coeficiente de variação			110,55%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.17 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de explantes contendo raízes”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de glutamina

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,09500	0,02375	0,6021 ns
Resíduo	45	1,77500	0,03944	
Total	49	1,87000		
Coeficiente de variação			82,75%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.18 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de eixos embrionários germinados”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de glutamina

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,01750	0,00438	0,2838 ns
Resíduo	45	0,69375	0,01542	
Total	49	0,71125		
Coeficiente de variação			275,92%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.19 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de calos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	1,25000	0,31250	8,4906 **
Resíduo	45	1,65625	0,03681	
Total	49	2,90625		
Coeficiente de variação			24,75%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.20 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	1,13250	0,28313	4,7297 **
Resíduo	45	2,69375	0,05986	
Total	49	3,82625		
Coeficiente de variação				

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.21 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de massas contendo embriões somáticos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,30750	0,07688	1,4959 ns
Resíduo	45	2,31250	0,05139	
Total	49	2,62000		
Coeficiente de variação			94,45%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.22 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de explantes contendo raízes”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,80500	0,20125	3,4094 *
Resíduo	45	2,65625	0,05903	
Total	49	3,46125		
Coeficiente de variação			53,40%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.23 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de eixos embrionários germinados”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	1,10750	0,27688	12,6171 **
Resíduo	45	0,98750	0,02194	
Total	49	2,09500		
Coeficiente de variação			92,59%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.24 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Concentração de 2,4-D	2	0,60139	0,30069	4,3885 *
Concentração de BAP	2	0,73889	0,36944	5,3919 **
Interação F1xF2	4	0,05694	0,01424	0,2078 ns
Tratamentos	8	1,39722	0,17465	2,5490 *
Resíduo	81	5,55000	0,06852	
Total	89	6,94722		
Coeficiente de variação			69,75%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.25 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de massas contendo embriões somáticos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Concentração de 2,4-D	2	0,66806	0,33403	5,7874 **
Concentração de BAP	2	0,34306	0,17153	2,9719 ns
Interação F1xF2	4	0,13611	0,03403	0,5896 ns
Tratamentos	8	1,14722	0,14340	2,4846 *
Resíduo	81	4,67500	0,05772	
Total	89	5,82222		
Coeficiente de variação			69,75%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.26 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de calos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de polivinilpirrolidona

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,03250	0,00812	0,1516 ns
Resíduo	45	2,41250	0,05361	
Total	49	2,44500		
Coeficiente de variação			33,56%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.27 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de polivinilpirrolidona

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,40000	0,10000	2,1429 ns
Resíduo	45	2,10000	0,04667	
Total	49	2,50000		
Coeficiente de variação			61,72%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.28 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de massas contendo embriões somáticos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de polivinilpirrolidona

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,21750	0,05438	1,4083 ns
Resíduo	45	1,73750	0,03861	
Total	49	1,95500		
Coeficiente de variação			70,18%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.29 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de explantes contendo raízes”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de polivinilpirrolidona

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,39250	0,09812	1,2482 ns
Resíduo	45	3,53750	0,07861	
Total	49	3,93000		
Coeficiente de variação			48,34%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.30 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de eixos embrionários germinados”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de polivinilpirrolidona

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,10750	0,02688	0,7834 ns
Resíduo	45	1,54375	0,03431	
Total	49	1,65125		
Coeficiente de variação			137,20%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.31 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de explantes oxidados”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, utilizando diferentes concentrações de polivinilpirrolidona

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,60500	0,15125	2,7157 *
Resíduo	45	2,50625	0,05569	
Total	49	3,11125		

Coeficiente de variação

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.32 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos em estágio globular”, na maturação de culturas de jabuticabeira

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	9	17056,73115	1895,19235	2,7684 **
Resíduo	90	61613,12780	684,59031	
Total	99	78669,85895		

Coeficiente de variação 88,62%

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.33 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos maduros”, na maturação de culturas de jabuticabeira

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	9	16854,86714	1873,87413	2,7381 **
Resíduo	90	61592,51209	684,36125	
Total	99	78457,37923		

Coeficiente de variação 37,14%

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.34 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos maiores que 2mm”, na maturação de culturas de jabuticabeira

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	9	13827,55403	1536,39489	2,9400 **
Resíduo	90	47032,85115	522,58724	
Total	99	60860,40519		

Coeficiente de variação 152,60%

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.35 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos em estágio globular”, na maturação de culturas de jabuticabeira utilizando diferentes concentrações de polietilenoglicol

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	1,01100	0,33700	6,9724 **
Resíduo	36	1,74000	0,04833	
Total	39	2,75100		
Coeficiente de variação			65,63%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.36 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos maduros”, na maturação de culturas de jabuticabeira utilizando diferentes concentrações de polietilenoglicol

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	1,01100	0,33700	6,9724 **
Resíduo	36	1,74000	0,04833	
Total	39	2,75100		
Coeficiente de variação			33,06%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.37 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos maiores que 2mm”, na maturação de culturas de jabuticabeira utilizando diferentes concentrações de polietilenoglicol

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	0,50400	0,16800	2,7491 *
Resíduo	36	2,20000	0,06111	
Total	39	2,70400		
Coeficiente de variação			88,29%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.38 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos maiores que 5mm”, na maturação de culturas de jabuticabeira utilizando diferentes concentrações de polietilenoglicol

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	0,30700	0,10233	5,7205 **
Resíduo	36	0,64400	0,01789	
Total	39	0,95100		
Coeficiente de variação			116,30%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.39 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos em estágio globular”, na maturação de culturas de jabuticabeira utilizando diferentes concentrações de ácido abscísico

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0,49486	0,08248	1,8426 ns
Resíduo	63	2,82000	0,04476	
Total	69	3,31486		
Coeficiente de variação			60,20%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.40 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos maduros”, na maturação de culturas de jabuticabeira utilizando diferentes concentrações de ácido abscísico

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0,49486	0,08248	1,8426 ns
Resíduo	63	2,82000	0,04476	
Total	69	3,31486		
Coeficiente de variação			32,62%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.41 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos maiores que 2 mm”, na maturação de culturas de jabuticabeira utilizando diferentes concentrações de ácido abscísico

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0,31771	0,05295	1,4379 ns
Resíduo	63	2,32000	0,03683	
Total	69	2,63771		
Coeficiente de variação			115,80%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.42 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de embriões somáticos maiores que 5 mm”, na maturação de culturas de jabuticabeira utilizando diferentes concentrações de ácido abscísico

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0,02171	0,00362	0,9344 ns
Resíduo	63	0,24400	0,00387	
Total	69	0,26571		
Coeficiente de variação			435,63%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.43 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de calos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, com diferentes tempos de permanência no 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,21750	0,05437	1,5850 ns
Resíduo	45	1,54375	0,03431	
Total	49	1,76125		
Coeficiente de variação			21,66%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.44 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de formação de massas pró-embriogênicas”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, com diferentes tempos de permanência no 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,27500	0,06875	1,3904 ns
Resíduo	45	2,22500	0,04944	
Total	49	2,50000		
Coeficiente de variação			40,43%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.45 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de massas contendo embriões somáticos”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, com diferentes tempos de permanência no 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,03000	0,00750	0,1271 ns
Resíduo	45	2,65625	0,05903	
Total	49	2,68625		
Coeficiente de variação			95,28%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.46 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de explantes contendo raízes”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, com diferentes tempos de permanência no 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,31750	0,07938	1,4468 ns
Resíduo	45	2,46875	0,05486	
Total	49	2,78625		
Coeficiente de variação			76,79%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)

ANEXO 3.47 - Resumo da análise de variância (ANOVA) para a variável “porcentagem de eixos embrionários germinados”, na calogênese de jabuticabeira a partir de sementes maduras, com diferentes tempos de permanência no 2,4-D

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	0,10000	0,02500	0,9783 ns
Resíduo	45	1,15000	0,02556	
Total	49	1,25000		
Coeficiente de variação			106,57%	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns não significativo ($p \geq 0,05$)