

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABRÍCIA LORRANE RODRIGUES OLIVEIRA

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM JABUTICABEIRA (*Plinia cauliflora* (Mart.)
Kausel)

Curitiba

2018

Fabrcia Lorrane Rodrigues Oliveira

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM JABUTICABEIRA (*Plinia cauliflora* (Mart.)
Kausel)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Agronomia, no Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Marguerite Quoirin.

Co-Orientadores: Moeses Andriago Danner, Juliana Degenhardt e Bruno Francisco Sant' Anna dos Santos.

Curitiba

2018

OL48e

Oliveira, Fabrícia Lorrane Rodrigues
Embriogênese somática em jabuticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel) /
Fabrícia Lorrane Rodrigues Oliveira. - Curitiba, 2018.
69 f.: il., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - (Produção
Vegetal).

Orientadora: Marguerite Quoirin

Coorientador: Moeses Andrigo Danne

Coorientadora: Juliana Degenhardt

Coorientador: Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos

1. Propagação vegetativa. 2. Myrtaceae. 3. Ácido diclorofenoxiacético. 4.
Embriogênese Somática. 5. Jabuticabeira. I. Quoirin, Marguerite. II. Danne,
Moeses Andrigo. III. Degenhardt, Juliana. IV. Santos, Bruno Francisco
Sant'Anna dos. V. Título. VI. Universidade Federal do Paraná.

CDU 634.42



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
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 dissertação de Mestrado de FABRICIA LORRANE RODRIGUES OLIVEIRA intitulada: EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM JABUTICABEIRA (*Plinia cauliflora* (Mart.)Kausel), 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 mestre está sujeita a 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, 07 de Março de 2018.

MARGUERITE GERMAINE GHISLAINE QUOIRIN

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LUIZ ANTONIO BIASI

Avaliador Interno (UFPR)

ROSETE PESCADOR

Avaliador Externo (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu sentimento de gratidão a todos que não pouparam esforços para que eu pudesse vivenciar esta experiência de aprendizado. Não me sinto merecedora e sim abençoada.

Por este motivo, gostaria de agradecer:

A Deus por justiça, graça e sabedoria.

Aos meus pais, Jaquelina Rodrigues e Osmar Gonçalves, e meus irmãos Frederico Gonçalves e Letícia Andrade pelo amor incondicional, carinho, apoio e compreensão em todos os momentos que me fiz ausente.

A minha orientadora Prof. Dr. Marguerite Quoirin, por me apoiar e incentivar na caminhada durante o período do mestrado. Obrigada pelo voto de confiança e auxílio nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Aos co-orientadores Prof. Dr. Bruno Francisco, Prof. Dr. Moeses Danner, e Dra. Juliana Degenhardt pelo apoio e confiança no trabalho realizado. E também ao professor Dr. Hugo Fraga, Dra. Leila Vieira e a professora Dra. Luciana Ribas por conversas sobre o tema, auxílio com experimentos e ideias para o aprimoramento de técnicas.

À UFPR e PPGAPV pela oportunidade de realizar o mestrado e a CAPES pela concessão da bolsa. À Lucimara Antunes pela ajuda em todos os momentos burocráticos na secretaria do programa.

À UTFPR- Câmpus Pato Branco, pelo apoio e financiamento das coletas de frutos realizados na região Sudoeste do Paraná. Também ao meu co-orientador Moeses Danner, a minha amiga Amanda Pacheco e ao meu namorado Iuri Morgenstern, pela ajuda durante a etapa de coleta a campo. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

As colegas do início do estágio na Embrapa Florestas: Jana, Gisela, Jéssica, Laudiane, Cassiana, Thais, vocês tiveram muita paciência comigo no início, me ensinando tudo sobre laboratório de micropropagação vegetativa. Serei grata a vocês para sempre. Além do profissional, me ensinaram a ser forte e jamais desistir dos meus objetivos.

Aos colegas do Laboratório de Micropropagação de Plantas: Sheila, Jean e Júlio pelo convívio e auxílio em todos os momentos.

Às amigas que estão sempre em meu coração apesar da distância: Alice, Ana Flavia, Marcella, Maria Eduarda, Isabela, Elisa, Marina e Daniela, por terem sempre acreditado em mim, pelo ombro e amizade eterna.

À minha amiga-irmã de casa, Fernanda Prado, que sempre me incentivou, alegrou e caminhou comigo cada minuto desse mestrado, me mostrando o quanto sou capaz e o quanto cada sofrimento é válido.

A todos vocês,

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) é uma árvore nativa e endêmica pertencente à família Myrtaceae, com distribuição nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. Devido à natureza recalcitrante de suas sementes e à falta de métodos eficientes de propagação vegetativa, ainda não estão estabelecidos pomares comerciais de jabuticabeira. A embriogênese somática pode ser uma alternativa para obtenção de grande número de plantas em curto espaço de tempo, em boas condições fitossanitárias. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de embriogênese somática a partir de sementes maduras de jabuticabeira. Os frutos foram coletados na cidade de Vitorino-PR e transportados até o laboratório da UFPR, em Curitiba. As sementes foram desinfestadas em etanol 70% (1 min) e hipoclorito de sódio 5% (10 min), seguido de lavagens em água destilada estéril. Os dois cotilédones foram separados e introduzidos individualmente, junto com eixos embrionários, em tubos de ensaio contendo meio de cultura. Para a indução de massas pró-embriogênicas (MPE) foram testadas três concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (5, 10 ou 15 μM sem carvão ativado e também diferentes concentrações de 2,4-D (100, 200, 300 e 500 μM), com carvão ativado (0,5; 1 ou 2 g.L^{-1}). Para iniciar a maturação dos embriões somáticos, foi testado carvão ativado (CA) (1 g.L^{-1}) e polietilenoglicol (PEG 4000) (30, 60 e 90 g.L^{-1}). Em seguida, as massas contendo embriões somáticos foram transferidas a vários meios, testando carvão ativado (1 g.L^{-1}), PEG (30 g.L^{-1}), Gelzan® (2; 2,5 e 3 g.L^{-1}), BAP (2, 4, 8 μM) e 0,5 μM de BAP+ GA₃ (1 e 2 μM). Para a indução de MPE, o melhor resultado (82,5% dos explantes) foi no meio MS, acrescido de 300 μM de 2,4-D e 1 g.L^{-1} de CA. Durante a fase I da maturação, o meio mais indicado para formação de embriões somáticos em estágio torpedo foi MS acrescido de 30 g.L^{-1} de PEG 4000 (77,5% de formação de embriões em estágio torpedo). Não houve conversão dos embriões somáticos em plântulas. A formação de embriões somáticos foi possível até o estágio cotiledonar (3,05%), formando embriões anormais. Os estudos anatômicos mostraram o desenvolvimento dos embriões somáticos assincrônicos e a reação das células ao 2,4-D, levando a morte celular.

PALAVRAS-CHAVE: 2,4D, Micropropagação, Myrtaceae.

ABSTRACT

The jaboticabeira (*Plinia cauliflora*) is a native and endemic tree belonging to the family Myrtaceae, with distribution in the Southeastern and Southern regions of Brazil. Due to the recalcitrant nature of its seeds and the lack of efficient methods of vegetative propagation, commercial jaboticaba orchards have not yet been established. Somatic embryogenesis can be an alternative to obtain large numbers of plants in a short time, in good phytosanitary conditions. With this, the objective of the present work was to develop a somatic embryogenesis protocol from mature seeds of jaboticabeira. The fruits were collected in the city of Vitorino-PR and transported to the UFPR laboratory in Curitiba. The seeds were disinfested in 70% ethanol (1 min) and 5% sodium hypochlorite (10 min), followed by washing in autoclaved distilled water. The two cotyledons were separated and introduced individually, together with embryonic axes, into test tubes containing culture medium. For the induction of pro-embryogenic masses (PEM), three concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were tested (5, 10 or 15 μM) without activated charcoal (AC) and then different concentrations of 2,4-D (100, 200, 300 and 500 μM) with AC (0.5, 1 or 2 g.L^{-1}) were used. To initiate maturation of somatic embryos, activated carbon (CA) (1 g.L^{-1}) and polyethylene glycol (PEG 4000) (30, 60 and 90 g.L^{-1}) were tested. Then, masses containing somatic embryos were transferred to various media by testing activated charcoal (1 g.L^{-1}), PEG (30 g.L^{-1}), Gelzan® (2, 2.5 and 3 g.L^{-1}), BAP, 4.8 μM) and 0.5 μM BAP + GA3 (1 and 2 μM). For the induction of MPE, the best result (82.5% of the explants) was in the MS medium, plus 300 μM of 2,4-D and 1 g.L^{-1} of CA. During phase I maturation, the most indicated medium for the formation of somatic embryos in the torpedo stage was MS plus 30 g.L^{-1} of PEG 4000 (77.5% embryo formation in the torpedo stage). There was no conversion of somatic embryos into seedlings. Formation of somatic embryos was possible until the cotyledonary stage (3.05%), forming abnormal embryos. The anatomical studies showed the development of somatic embryos asynchronous and the reaction of the cells to 2,4-D, leading to cell death.

KEY WORDS: 2,4-D, Micropropagation, Myrtaceae

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ZIGÓTICA, COMPARANDO-OS E MOSTRANDO A SIMILARIDADE ENTRE OS PROCESSOS MORFOGENÉTICOS.....21
- FIGURA 2:** FRUTOS DE JABUTICABEIRA (*Plinia cauliflora*).....28
- FIGURA 3:** FORMAÇÃO DE MASSAS PRÉ EMBRIOGÊNICAS E EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE SEMENTES DE *Plinia cauliflora*.....32
- FIGURA 4:** CULTURA DE COTILÉDONES DE *Plinia cauliflora*, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO EM MEIO MS.....37
- FIGURA 5:** MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS, 30 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA DAS MASSAS PRÉ-EMBRIOGÊNICAS PARA MEIO.....39
- FIGURA 6:** MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora* COM EMBRIÕES EM ESTÁDIO DE TORPEDO CIRCULADOS EM VERMELHO.....40
- FIGURA 8:** MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *P. cauliflora*, E EMBRIOGÊNESE REPETITIVA.....45
- FIGURA 9:** CORTES ANATÔMICOS EM EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora*.....49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Plinia cauliflora</i>	26
TABELA 2: OXIDAÇÃO E CONTAMINAÇÃO EM TESTES DE DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Plinia cauliflora</i> PARA O ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	31
TABELA 3: GERMINAÇÃO, OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS EM CULTURAS DE COTILÉDONES DE JABUTICABEIRA, CONFORME CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D EM MEIO DE CULTURA MS, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	33
TABELA 4: OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE MASSAS PRÉ- EMBRIOGÊNICAS EM CULTURAS DE COTILÉDONES DE JABUTICABEIRA, CONFORME CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE CARVÃO ATIVADO, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	36
TABELA 5: EFEITO DO POLIETILENOGLICOL (PEG) E DO CARVÃO ATIVADO (CA) NA OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM COTILÉDONES DE JABUTICABEIRA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MSPOR 30 DIAS.....	37
TABELA 6: OXIDAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>P. cauliflora</i> , CULTIVADOS EM MEIO MS CONTENDO 1 g.L ⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU 30 G.L ⁻¹ DE PEG, APÓS 30 DIAS.....	41
TABELA 7: OXIDAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>P. cauliflora</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE GELZAN®, POR 30 DIAS.....	42

TABELA 8: OXIDAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>P. cauliflora</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE BAP	POR	30
DIAS.....		43

TABELA 10: OXIDAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>P. cauliflora</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE 1 e 2 μM GA_3 + 0,5 μM BAP, 30 DIAS <i>IN VITRO</i>		46
--	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético
BAP – Benzilaminopurina
CA – Carvão ativado
GA₃ – Ácido Giberélico
PPM[®] – Plant Preservative Mixture
PR – Paraná
UFPR – Universidade Federal do Paraná
min. – Minuto
MPE – Massas pró-embriogênicas
PEG – Polietilenoglicol
MS – Murashige e Skoog
FAA₅₀ – Formaldeído, ácido acético, álcool 50%
ANOVA – Análise de Variância
DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 JABUTICABA.....	18
2.1.1 Histórico, origem	18
2.1.2 Aspectos botânicos, morfológicos e fenológicos	18
2.1.3 Aplicações comerciais	19
2.2 MICROPROPAGAÇÃO	20
2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	22
2.3.1 Aspectos gerais.....	22
2.3.2 Embriogênese somática em Myrtaceae	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 LOCAL DE ESTUDO	27
3.2 MATERIAL VEGETAL	27
3.3 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES E INTRODUÇÃO IN VITRO.....	27
3.4 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTURA	28
3.5 MEIOS DE INDUÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS	29
3.6 FASE I DA MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	30
3.7 FASE II DA MATURAÇÃO E CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS	31
3.8 ANÁLISES ANATÔMICAS.....	31
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES.....	33
4.2 MEIOS DE CULTURA NA INDUÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS E CONDIÇÕES DE CULTURA	34
4.2.1 Efeito do 2,4-D na indução da embriogênese somática	34

4.2.2.Efeito do 2,4-D e do carvão ativado na indução da embriogênese somática.....	36
4.3 FASE I DA MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	39
4.4 FASE II DA MATURAÇÃO E CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS	42
4.4.1Efeito do PEG e do carvão ativado	42
4.4.2 Efeito do Gelzan®.....	43
4.4.3 Efeito da BAP.....	44
4.4.4 Efeito do GA ₃ combinado com BAP.....	45
4.5 ANÁLISES ANATÔMICAS DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS.....	48
5. CONCLUSÕES	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	62

1. INTRODUÇÃO

O Estado do Paraná possuía, até o final século XX, uma grande extensão territorial coberta por florestas onde a região Sudoeste se caracterizava pela formação florestal denominada Floresta Ombrófila Mista ou Floresta de Araucária. No último inventário realizado no estado do Paraná, verificou-se que fragmentos florestais mais conservados (em estágio avançado de sucessão) representavam apenas 0,8% da área original de Floresta de Araucária (CASTELLA e BRITZ, 2004). Essa situação faz com que as florestas se apresentem muito fragmentadas, com risco de grave erosão genética de espécies vegetais, dentre estas a jabuticabeira (*Plinia* sp.). Na região Sudoeste do Paraná, foi realizado um estudo no qual foram mapeados 14 fragmentos florestais contendo jabuticabeiras da espécie *Plinia cauliflora*, em que foram registradas 4.036 jabuticabeiras adultas em 201 hectares de matas (DANNER et al., 2010).

A jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) pertence à família Myrtaceae e é endêmica do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. São conhecidas nove espécies, algumas já consideradas em extinção, das quais apenas três tem distribuição natural e são cultivadas no Brasil: *Plinia peruviana* (*ex-trunciflora*) (Poir.) Govaerts; *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel e *Plinia jaboticaba* (Vell.) Kausel (MATTOS, 1983). Os frutos de jabuticabeira (jaboticabas) apresentam grande potencial de comercialização, pois são muito apreciados para consumo *in natura* (BALERDI et al., 2006). Além disso, a jaboticaba apresenta alto teor de antocianinas e flavonoides na casca (DANNER et al., 2011a), o que pode ser aproveitado pela indústria farmacêutica e alimentícia.

Esta fruteira nativa pode ser uma alternativa de produção, principalmente para pequenos agricultores familiares. Entretanto, o alto custo das mudas é um problema para a expansão dos pomares comerciais de jabuticabeira que apresenta dificuldade de obtenção de mudas através de processos de propagação vegetativa, como a estaquia, em que se obteve baixo enraizamento (menos que 20%) nos trabalhos realizados (LEONEL et al., 1991; DUARTE; HUETE; LÜDDERS, 1997; SCARPARE FILHO et al., 1999;

CASAGRANDE Jr. et al., 2000; SCARPARE et al., 2002; PEREIRA et al., 2005; SASSO et al., 2010a).

Mesmo considerando os avanços obtidos na propagação assexuada da jabuticabeira (DUARTE et al., 1997; DANNER et al., 2006; SASSO et al., 2010), na prática, o principal método de obtenção de mudas ainda é por sementes, por ser uma espécie de difícil enraizamento de estacas (SCARPARE FILHO et al., 1999; SASSO, 2009). Porém, as sementes da jabuticabeira perdem rapidamente a viabilidade (VALIO; FERREIRA, 1992), o que as caracteriza como sementes recalcitrantes.

Tendo em vista o longo período que esta espécie leva para começar a produzir, que oscila de oito a quinze anos após o plantio da muda oriunda de sementes, o uso de técnicas de propagação vegetativa é relevante, uma vez que estas podem antecipar o período reprodutivo da espécie e contribuir diretamente para a exploração econômica da jabuticabeira. Além disso, a propagação vegetativa proporciona a manutenção das características da planta-matriz nos descendentes, assegurando a formação de pomares homogêneos.

A técnica de embriogênese somática apresenta vantagens, quando comparada a qualquer outro processo de propagação: alta taxa de multiplicação, escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio de cultura, plantio direto da muda obtida via ES, sem necessidade de enxertia, com menor custo de produção, além da planta ser geneticamente igual à planta-mãe e possibilidade de transferência de genes. Por essas razões, a embriogênese somática tem sido utilizada como ferramenta em estudos de desenvolvimento de plantas, propagação clonal e melhoramento genético (CARVALHO et al., 2006).

Alguns estudos de desinfestação e estabelecimento *in vitro* de fruteiras nativas da família Myrtaceae são relatados para goiabeira serrana, pitangueira (SOUZA et al., 2006), araçazeiro (SOUZA; SCHUCH; SILVA, 2006) e jabuticabeira (PICOLOTTO et al., 2007).

A técnica da embriogênese somática em *Plinia trunciflora*, *Plinia cauliflora*, assim como para outras espécies da família myrtaceae (*Campomanesia xanthocarpa*), vem sendo estudada desde 2014 no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Botânica na

Universidade Federal do Paraná. Há resultados positivos quanto a desinfestação dos explantes utilizados, também pesquisas no estabelecimento das culturas *in vitro*, porém ainda não foi alcançado um protocolo completo de embriogênese somática para as espécies. O desenvolvimento destas técnicas de propagação em jabuticabeira poderá trazer vantagens adicionais, como a obtenção de grande número de plantas livres de patógenos em pequeno espaço físico e em curto espaço de tempo.

Para estabelecer um protocolo de ES para *P. cauliflora*, são necessários experimentos que permitam introduzir explantes *in vitro*, selecionar o melhor modo de indução de massas pró-embriogênicas, obtenção de embriões somáticos maduros e conversão em plântulas.

O presente trabalho visou estabelecer um protocolo de embriogênese somática a partir de sementes maduras de jabuticabeira (*Plinia cauliflora*).

Como objetivos específicos têm-se:

- Otimizar o método de armazenamento e transporte dos frutos ou sementes;
- Desenvolver um método eficiente de desinfestação das sementes;
- Avaliar o efeito da suplementação de diferentes reguladores vegetais, polietilenoglicol e carvão ativado durante as fases de indução e maturação dos embriões somáticos;
- Realizar estudos morfoanatomicos dos calos visando identificar a formação de estruturas embriogênicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 JABUTICABA

2.1.1 Histórico, origem

O nome jabuticaba tem origem indígena, chamado assim pelos Tupis, que desde sua época apreciavam os frutos e também os produtos do fruto fermentados. Segundo os indígenas, o nome Jabuticaba têm o significado de “frutas em botão” (SALLIS, 2002). Comumente encontrada em parques, jardins e calçadas de diversas ruas, tanto de cidades grandes como pequenas, a jabuticabeira desperta a curiosidade e a lembrança de tempos passados (SUGUINO et al., 2012).

A jabuticabeira é originada na América do Sul (Brasil) e também possui ocorrência no Paraguai, Uruguai e Argentina. Também conhecida como jabuticaba-assu, jabuticaba-de-campina, jaboticabeira, jabuticatuba, jabuticaba paulista, jabuticaba-açu, jabuticaba-do-mato, jabuticaba-painhema, entre outros. As jabuticabeiras pertencem à família Myrtaceae, uma das mais importantes famílias, devido à quantidade de espécies descritas (atualmente 5.950), e por possuir ocorrência em todo o Brasil (GOMES, 1976)

2.1.2 Aspectos botânicos, morfológicos e fenológicos

Segundo Kausel (1956), o caule possui casca com textura membranácea e troco liso. A folha possui ápice agudo, base cuneada, forma elíptica, indumento glabro, margem plana, superfície glabra e tamanho de 5,5 à 10 cm de comprimento. As flores são aglomeradas com pedúnculo de cerca de 1 mm de comprimento sobre o tronco e ramos mais ou menos velhos protegidos por quatro séries de brácteas ciliadas. Os ovários possuem 0,7 mm

de comprimento; o estilete 6,5 mm de comprimento, branco e glabro (MATTOS, 1983).

A vegetação ocorre de forma intensa no fim do inverno e início da primavera, antecedendo a época principal de sua floração. A floração ocorre no tronco e nos ramos após a ruptura da casca. Cada flor produz grande quantidade de pólen que fica disponível para polinização e fecundação, ao passo que o estigma está disponível desde o momento da abertura da flor. Com isso, ocorre a autopolinização e também a polinização cruzada (SUGUINO et al., 2012). Sob condições ideais de clima e cultivo, podem ocorrer até cinco floradas por ano (MATTOS, 1983).

O fruto possui aproximadamente 2 a 5 cm de diâmetro, é globoso, redondo, nas cores roxas ou pretas, com polpa succulenta, mole, geralmente doce e esbranquiçada (LORENZI et al., 2006).

As sementes de jabuticaba são poliembrionicas. A poliembrionia é a formação conjunta de dois ou mais indivíduos na reprodução sexuada quando, após a fecundação de um único óvulo e as clivagens iniciais do embrião, este se parte, originando indivíduos geneticamente idênticos, ou seja, poliembrionia é o fenômeno em que se confere a formação de vários embriões a partir de um único zigoto (MOREIRA, 1996).

2.1.3 Aplicações comerciais

A espécie *Plinia cauliflora* possui diversas características de interesse. A polpa de seus frutos contém ferro, fósforo, vitamina C e altas concentrações de niacina, uma vitamina do complexo B que facilita a digestão e ajuda a eliminar toxinas. Na casca escura do fruto existe pectina e peonidina, além de outras antocianinas, responsável pela coloração azul-arroxeadada da mesma (MUNHOZ et al., 2014). Esta cor atrai os dispersores de sementes, garantindo a perpetuação da espécie. Para a medicina, o interesse nas antocianinas é por apresentarem potente ação antioxidante, ou seja, ajudam a eliminar do organismo moléculas instáveis de radicais livres (MUNHOZ et al., 2014). Nos últimos tempos, surgiram estudos os quais apontam que substâncias

antioxidantes também auxiliariam na estabilização dos níveis açúcar no sangue dos diabéticos (MACHADO et al., 2013).

O fruto pode ser consumido na sua forma natural ou também usado na preparação de doces, geleias, licores, vinhos, vinagres, aguardentes, entre outros. Na medicina fitoterápica, utiliza-se o chá de casca para tratar anginas, erisipelas, asma, quando utilizado em gargarejos, sendo também eficaz contra inflamações agudas e crônicas na boca (MATTOS, 1983).

A árvore possui aspectos ornamentais, podendo ser utilizada em paisagismo geral, apesar de gerar resíduos provocados pela queda de seus frutos, aspecto um tanto quanto negativo para a utilização em espaços urbanos (SUGUINO et. al., 2012).

2.2 MICROPROPAGAÇÃO

A propagação vegetativa consiste em multiplicar assexuadamente partes de plantas (células, tecidos, órgãos ou propágulos), originando indivíduos geralmente idênticos à planta-mãe. É uma técnica cada vez mais adotada em nível mundial, principalmente por sua maior efetividade em capturar os ganhos genéticos obtidos dos programas de melhoramento (KÄMPF, 2000).

Segundo Xavier et al. (2009), a propagação *in vitro* é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto, uma vez que permite condições para se obter plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em menor espaço de tempo, comparativamente ao melhoramento convencional. Trata-se de uma forma de propagação assexuada, em que se utilizam explantes do vegetal, os quais, por meio de divisões celulares induzidas pelos hormônios vegetais e pelos fitorreguladores, produzem grande quantidade de indivíduos, genética e fenotipicamente idênticos, podendo ser conduzida pela proliferação de gemas axilares, indução de gemas adventícias por organogênese, direta ou indireta, e embriogênese somática, direta ou indireta, ou seja, o embrião somático se origina diretamente do explante ou se desenvolve de células de calo, depois de um período de proliferação.

A aplicação de novas tecnologias associadas ao melhoramento genético convencional requer protocolos que permitam regenerar plantas a partir de grupos de células vegetais, explorando a totipotência das plantas (GONZÁLEZ, 2002). Conforme Taiz e Zeiger (2016), a totipotência é a conservação da capacidade genética total para o desenvolvimento de uma nova planta, em células já diferenciadas. Com isso, fragmentos de tecidos vegetais vivos (denominados explantes) são retirados de plantas e cultivados em meio nutritivo definido ou indefinido, sob condições assépticas (GOLLE, 2010). Os estudos de cultura de tecidos tem proporcionado a regeneração de plantas através de várias rotas morfogenéticas, tais como a cultura de calos, cultura de células em suspensão, indução da embriogênese somática, indução da organogênese e o isolamento e cultivo de protoplastos (MICHELUZZI, 2007).

Diversos fatores são primordiais para o sucesso da cultura de tecidos. O genótipo e o estado fisiológico da planta matriz proporcionam diferentes respostas no processo de regeneração. Um dos aspectos mais importantes para estabelecer um protocolo de regeneração de plantas a partir do cultivo *in vitro* é o meio de cultura, o qual deve atender às necessidades de cada espécie. De acordo com Gonzalez (2002), o meio de cultura deve conter todas as substâncias que os tecidos normalmente obtêm do floema e do xilema. Os componentes do meio de cultura são divididos em quatro grandes categorias: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos (ALVES, 2001).

Outro fator que influencia e determina a morfogênese nos tecidos em cultura é a ação dos reguladores vegetais mediante sua interação com receptores dentro da célula vegetal. Castro e Vieira (2001) definiram os reguladores como substâncias sintéticas que, quando aplicadas exogenamente, possuem ações similares aos grupos de hormônios vegetais conhecidos. Os principais reguladores vegetais utilizados pertencem aos grupos das auxinas, citocininas e giberelinas. O balanço entre estes reguladores altera a resposta das células no cultivo, onde pode-se induzir a formação de tecidos desejados.

É necessário também definir o explante utilizado na cultura de tecidos, que pode ser segmento de folha, embrião maduro ou imaturo, receptáculo floral, entre outros. Se as plantas que serão cultivadas têm reprodução por sementes, as partes embrionárias ou as plântulas germinadas em condições

assépticas também podem ser usadas como explantes (VILLALOBOS e THORPE, 1991). Segundo esses autores, o estado fisiológico da planta doadora influencia significativamente a sua capacidade morfogenética. Plantas bem nutridas e sem sintomas de deficiência nutricional fornecem explantes com melhor capacidade regenerativa (GEORGE,1993). A idade fisiológica da planta também influencia o seu potencial regenerativo, pois, em geral, explantes provenientes de tecidos juvenis apresentam maior facilidade de se desdiferenciar e rediferenciar do que explantes de plantas adultas. Quanto maior a determinação de um explante para uma via de desenvolvimento, menor será a competência para se desdiferenciar e formar um novo tecido (BONGA e ADERKAS, 1992).

2.3 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

2.3.1 Aspectos gerais

Dentre as técnicas de micropropagação, a embriogênese somática é uma das principais que possui vantagens comparativamente às demais técnicas. Esta técnica é aplicável à conservação de germoplasma vegetal e para a propagação em larga escala de clones elites de plantas perenes como as coníferas e as angiospermas arbóreas (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007).

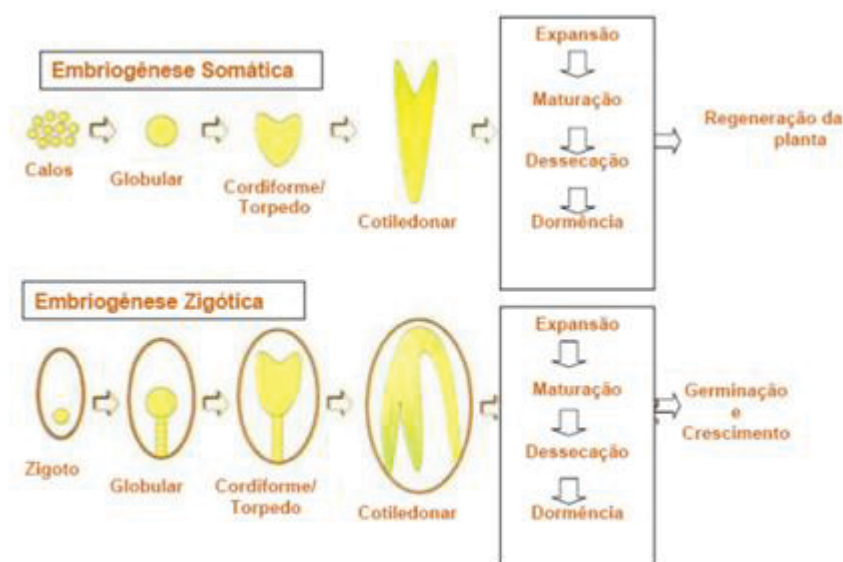
A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem estruturas análogas a embriões zigóticos, por meio de uma sequência ordenada de estádios embriogênicos característicos (Figura 1), sem ocorrência de fusão dos gametas (GUERRA et al., 1999; JIMÉNEZ, 2001). Durante o seu desenvolvimento, embriões somáticos passam por estádios similares àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizando-se como estrutura bipolar sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (DURZAN, 1988; VICIENT e MARTINEZ, 1998).

O desenvolvimento dos embriões somáticos (ES) pode ser dividido em quatro fases distintas: 1) a indução de massas pró-embriogênicas em meio de

cultura contendo auxinas e citocininas; 2) a multiplicação de massas pró-embriogênicas em meio contendo auxinas em baixas concentrações; 3) a maturação dos embriões somáticos em meio contendo agentes osmóticos e podendo conter ou não regulador (ABA); 4) a conversão ou germinação, podendo ser realizada sem a presença de reguladores de crescimento (FLOH et al., 2007).

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ZIGÓTICA, COMPARANDO-OS E MOSTRANDO A SIMILARIDADE ENTRE OS PROCESSOS MORFOGENÉTICOS.

FONTE: MORAES, 2006.



Na embriogênese somática *in vitro*, padrões de divisão e diferenciação celular, informações posicionais e sinais de desenvolvimento podem ser facilmente alterados (FEHÉR et al., 2003). Essas alterações podem ser expressas por duas vias: na primeira, a indução da embriogênese somática provoca a formação de embriões somáticos no tecido matriz sem passar por fase de calo (direta); na segunda, há a formação de um estágio intermediário de calo no tecido matriz, existindo células em diversos estágios de diferenciação, as quais podem ser induzidas ou direcionadas, por meio de reguladores de crescimento, para a aquisição de novas competências (GUERRA et al., 1999).

A embriogênese somática é um processo complexo e seu sucesso depende do controle de grande número de variáveis, uma vez que cada espécie apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, pelo estado fisiológico da planta matriz e pelo efeito do meio sobre fatores endógenos (JIMÉNEZ, 2005). Dentre os reguladores de crescimento, o mais utilizado para indução da embriogênese somática é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que aparentemente promove um gradiente de distribuição de auxinas *in vivo*, possivelmente através do estímulo de proteases de repressores de transcrição de genes da via de biossíntese desse regulador, e consequente sinalização entre as células (JIMÉNEZ, 2005). Dessa forma, é estabelecido um gradiente no eixo ápice-base (caule-raiz), prosseguindo o desenvolvimento com as demais fases da embriogênese somática (JENIK e BARTON, 2005).

Na maior parte das vezes, a embriogênese somática é induzida na presença apenas de uma auxina ou pela sua combinação com uma citocinina, porém em alguns casos a utilização de apenas uma citocinina é efetiva tanto para indução, quanto para a maturação dos embriões somáticos (PAUL et al., 2011).

Após a indução de culturas embriogênicas, a maturação de embriões somáticos é um passo adicional necessário. Vários agentes que promovem a maturação do embrião somático têm sido utilizados, como o polietilenoglicol (PEG), que é um polímero de alto peso molecular que não é permeável à membrana plasmática da célula e, portanto, não é metabolizado (Stasolla e Yeung 2003). O PEG tem sido utilizado em culturas de plantas e células de diversas espécies para simular os efeitos do estresse hídrico (El-Tayeb e Hassanein 2000) ou para estimular a maturação e conversão de embriões somáticos em plântulas, semelhantes àquelas originadas de sementes, como observado em (*Cryptomeria japonica* (Maruyama e Hosoi 2007), *Abies cephalonica* (Krajnakova e outros, 2009), *Pinus sylvestris* (Keinonen-Metta e outros, 1996), *Abies numidica* (Vooková e Kormuták 2002), *Panax ginseng* (Langhansov et al. *Aesculus hippocastanum* (Calic-Dragosavac et al., 2010) e *Carica papaya* L. (Koehler et al., 2013).

O tipo de estresse causado pelo PEG é essencial para desenvolver o embrião somático, uma vez que induz o acúmulo de compostos armazenados

(Stasolla e Yeung 2003) e a modificação da metilação do DNA (Smulders e de Klerk 2011), fazendo com que o embrião complete o desenvolvimento. proceder para converter em uma muda normal. Substâncias de armazenamento são usadas para fornecer nutrientes e induzir a tolerância à dessecação durante a conversão do embrião (Coelho e Benedito 2008).

2.3.2 Embriogênese somática em Myrtaceae

As técnicas de cultura de tecidos vegetais apresentam grande potencial de uso para o melhoramento e conservação de germoplasma de Myrtaceae (GUERRA et al., 1999).

Em Myrtaceae, problemas fitossanitários (doenças por vírus, bactérias e fungos) assim como de propagação (sementes recalcitrantes, baixo enraizamento) impedem a propagação das espécies em larga escala. A embriogênese somática é uma alternativa para sanar todos esses problemas. Porém, para otimizar o processo e obter sucesso, são necessários alguns cuidados preliminares e durante a execução da propagação massal *in vitro*: selecionar o melhor explante a utilizar para obter sucesso, determinar o modo de desinfestação desses explantes, as condições de indução, de multiplicação das massas embriogênicas, de maturação e conversão, podendo chegar até a fase de aclimatização das plantas em casa de vegetação.

Os explantes mais utilizados para a propagação de Myrtaceae *in vitro* via embriogênese somática são: brotos apicais (CORREDOIRA et al, 2015), regiões cotiledonares (CRUZ et al., 1990; TITON et al., 2007), embriões maduros (BAJPAI et al., 2016; TITON et al., 2007; DAL VESCO 1999, CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007; CAPRESTANO et al., 2004; GUERRA et al., 2001), embriões imaturos (DAL VESCO 1999) e flores (pistilos, anteras) (STEFANELLO et al., 2005)

O 2,4-D foi adicionado em meio de cultura para indução de massas pró-embriogênicas em culturas de *Acca sellowiana* (GUERRA et al., 2001; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999), *Psidium guajava* (NASIM, 2010; BAJPAI et al., 2016), *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007) em concentrações que variam de 2 a 20

μM (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007). Outra auxina utilizada para a indução de embriões somáticos em Myrtaceae é o Picloram (CANHOTO et al., 1999).

Alguns aminoácidos adicionados ao meio de cultura auxiliam no desenvolvimento dos embriões somáticos. É o caso, por exemplo, da glutamina, que apresenta bons resultados em relação ao número de embriões somáticos formados em *Acca sellowiana* (DAL VESCO e GUERRA, 2001) e *Psidium guajava* (BAJPAI et al., 2016).

Diferentes agentes com potencial osmótico, como açúcares e polietilenoglicol (PEG), podem ser utilizados durante a maturação (VON ARNOLD et al., 2002). 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.

Segundo Bajpai et al. (2016), a conversão é o estágio crítico para o estabelecimento de um protocolo de regeneração eficiente. Estudos relatam que a combinação de citocininas e GA_3 resultaram em uma alta taxa de conversão de plantas em *Acca sellowiana* (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007) e *Myrtus communis*(CANHOTO et al., 1999). Por outro lado, para a conversão de embriões somáticos de *Psidium guajava*, não foi necessária a adição de reguladores (RAI et al., 2007; NASIM, 2010).

O aprimoramento de um protocolo de propagação clonal pode possibilitar a elucidação de processos aplicados à propagação e conservação de *Plinia cauliflora*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos de embriogênese somática foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal e as análises anatômicas no Laboratório de Anatomia e Biomecânica, localizados no Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, na cidade de Curitiba-PR.

3.2 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados frutos de jabuticaba (*Plinia cauliflora*), coletados de apenas uma árvore, em remanescentes florestais contendo plantas nativas de jabuticabeira, localizados na cidade de Vitorino na região Sudoeste do Paraná, pertencentes ao Ecossistema Floresta de Araucária. Os frutos foram transportados do local de coleta até Curitiba (24 horas), em caixa de isopor com gelo e foram despoldados manualmente no laboratório (Figura 2A), utilizando as sementes para estabelecimento da embriogênese somática *in vitro*.

3.3 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES E INTRODUÇÃO IN VITRO

As sementes foram submetidas à desinfestação em câmara de fluxo laminar (Figura 2B, C) com etanol 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio 5% acrescido de 0,01% de Tween-20[®], em diferentes tempos (10, 15 e 20 minutos) (Tabela 1) com Plant Preservative Mixture[®] (PPM) adicionado ao meio de cultura antes da autoclavagem, e sem PPM. Em seguida, foram enxaguadas três vezes em água destilada autoclavada. As sementes foram

abertas e os cotilédones foram separados e introduzidos individualmente, junto com os eixos embrionários (por a semente ser poliembriônica), em tubos de ensaio com 15 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro (Figura 2D), contendo 10 ml de meio de cultura, tampados com tampa de pressão em polipropileno. Foram 40 tubos por tratamento.

TABELA 1: TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE *Plinia cauliflora*.

Tratamento	Processo de Desinfestação
1	Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (10 min)
2	Tratamento 1 + 1 ml.L ⁻¹ PPM no meio de cultura
3	Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (15 min)
4	Tratamento 3 + 1 ml.L ⁻¹ PPM no meio de cultura
5	Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (20 min)
6	Tratamento 5 + 1 ml.L ⁻¹ PPM no meio de cultura

3.4 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTURA

O meio de cultura base continha os sais e vitaminas do MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 0,6% de ágar (Vetec®). Utilizou-se Gelzan® nos experimentos de maturação, nas concentrações de 2, 2,5 e 3 g.L⁻¹. O pH de todos os meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos.

Na etapa de indução de embriões somáticos e na etapa de maturação fase I, as culturas foram colocadas em sala de crescimento no escuro, a 25 ± 2 °C. Na fase de maturação fase II, as culturas foram colocadas na mesma temperatura, em fotoperíodo de 16h, sob luz branca fluorescente com DFFF (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) de aproximadamente 30 μmol.m⁻².s⁻¹.

3.5 MEIOS DE INDUÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS

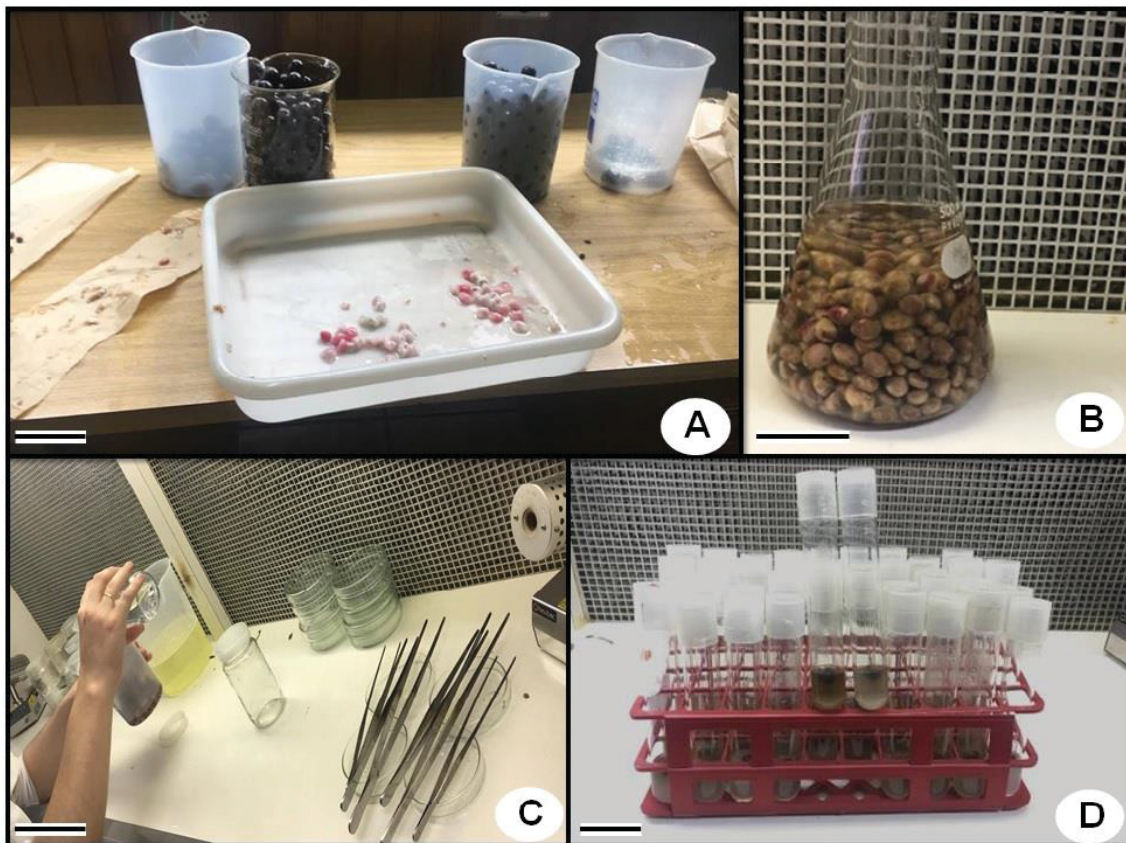
No primeiro experimento, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi adicionado ao meio de cultura base nas concentrações de 5, 10 ou 15 μM , contendo 1 mL.L^{-1} de PPM.

Em outro experimento foi adicionado carvão ativado (CA) ao meio base, nas concentrações de 0,5, 1 e 2 g.L^{-1} e 3 mL.L^{-1} de PPM. Nesse caso, a concentração do 2,4-D foi aumentada, utilizando 100, 200, 300 e 500 μM .

Utilizou-se 40 cotilédones (com eixos embrionários) por tratamento e as culturas foram mantidas no escuro, em sala de crescimento, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Esses tratamentos foram realizados com sementes do tratamento T2 (Tópico 3.3).

Sessenta dias após a indução e avaliou-se a porcentagem de explantes oxidados, dos eixos embrionários germinados e de explantes formando massas pró-embriogênicas (MPE).

FIGURA 2 – (A) FRUTOS DE JABUTICABEIRA (*Plinia cauliflora*), E REMOÇÃO DA MUCILAGEM ADERIDA ÀS SEMENTES; (B) SEMENTES DE JABUTICABEIRA ARMAZENADAS EM ÁGUA ANTES DO PROCESSO DE DESINFESTAÇÃO; (C) DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES EM FLUXO LAMINAR; (D) CULTURA *IN VITRO*. BARRA: 1 CM.



3.6 FASE I DA MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

Após 60 dias de indução, as massas pró-embriogênicas foram transferidas para meio de base sem reguladores, com CA (1 g.L^{-1}) e PEG 4000 (30, 60 e 90 g.L^{-1}). As culturas foram mantidas no escuro, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após 30 dias avaliou-se a oxidação e a porcentagem de massas pró-embriogênicas (MPE) formando embriões em cada estágio (globular, torpedó e cotiledonar). Foram utilizados 40 tubos por tratamento.

3.7 FASE II DA MATURAÇÃO E CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

Os embriões somáticos em estágio de torpedo obtidos na fase I foram transferidos para o meio de base adicionado de vários compostos, e cultivados na presença de luz.

Foram realizados quatro experimentos, testando a presença dos compostos a seguir:

- CA (1 g.L^{-1}) ou PEG 4000 (30 g.L^{-1}),
- Gelzan® (2; 2,5 e 3 g.L^{-1}),
- 6-benzylaminopurina (BAP) (2, 4 e $8 \mu\text{M}$)
- combinações de BAP ($0,5 \mu\text{M}$) com ácido giberélico (GA_3) (1 e $2 \mu\text{M}$).

Cada um dos experimentos foi instalado em placas de Petri (5 placas por tratamento) contendo 12 embriões em estágio de torpedo em cada placa, totalizando assim 60 embriões por tratamento.

Todos os tratamentos foram mantidos sob fotoperíodo de 16h, sob luz branca fluorescente com DFFF (densidade de fluxo de fótons fotossintéticos) de aproximadamente $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

As culturas foram avaliadas após 30 dias quanto à presença de oxidação parcial, sobrevivência (cor verde) e conversão em plântulas (emissão de radícula e parte aérea).

3.8 ANÁLISES ANATÔMICAS

Amostras de estruturas obtidas nas fases de indução, fase I e II da maturação dos embriões somáticos foram coletadas aleatoriamente para estudo anatômico. O material foi fixado em FAA_{70} (JOHANSEN, 1940) e desidratado em séries etanólicas crescentes (etanol 70, 80, 85, 90, 95 e 100%), por 1 hora em cada concentração. Após a desidratação, as amostras passaram por uma pré-infiltração (etanol (50%) + historesina (50%)), por 24 horas, realizando vácuo a cada 12 horas. Colocou-se para infiltrar em historesina Leica® (100%), por 72 horas, realizando vácuo a cada 12 horas. As amostras foram emblocadas em historesina e endurecedor Leica®, de acordo com as

recomendações do fabricante. O material emblocado foi seccionado em micrótomo rotativo, em espessura de cerca de 10 μm , e corado com azul de toluidina. Lâminas temporárias foram montadas com água e analisadas em microscópio. As fotografias foram obtidas a partir de um microscópio Olympus BX41, com câmera fotográfica acoplada Olympus SC30.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os experimentos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos em todos os testes foram submetidos ao teste de Bartlett para verificação da homogeneidade das variâncias dos tratamentos; em seguida, todos os dados foram transformados por $\sqrt{(x + 1)}$. As médias de cada tratamento foram comparadas por meio do teste de Tukey a 1 e 5% de probabilidade. O software estatístico utilizado foi o Assistat, versão 7.7pt. (SILVA, 2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES

Os melhores tratamentos para evitar a contaminação foram os meios contendo PPM, um biocida de amplo espectro que controla bactérias e fungos. As porcentagens de contaminação foram inferiores nos meios contendo PPM e não diferiram estatisticamente entre os três tratamentos (T2, T4, T6), porém, quanto maior o tempo de exposição ao hipoclorito de sódio, maiores foram às porcentagens de oxidação (Tabela 3, Anexos 2 e 3). Com isso, o tratamento de desinfestação recomendado é o T2 (Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (10 min)+ 1 ml.L⁻¹ PPM no meio de cultivo).

TABELA 3: OXIDAÇÃO E CONTAMINAÇÃO EM TESTES DE DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE *Plinia cauliflora* PARA O ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.

TRATAMENTO	OXIDAÇÃO (%)	CONTAMINAÇÃO (%)
T1	7,5cd	85,0 a
T2	5,0 d	5,0 c
T3	30,0 b	72,5a
T4	25,0 bc	7,5 c
T5	75 a	37,5 b
T6	67,5 a	7,5 c
CV(%)	31,28	37,67

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

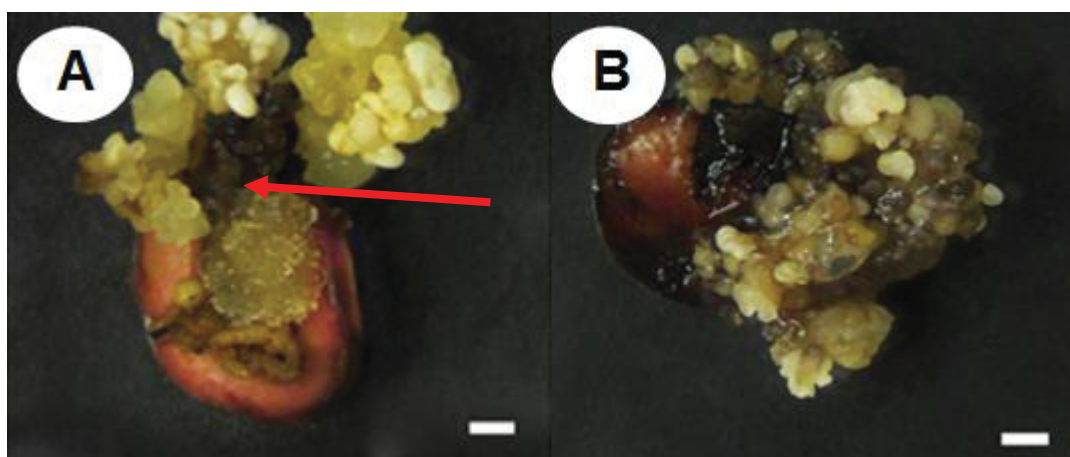
T1- Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (10 min); **T2-** Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (10 min)+ 1 ml.L⁻¹PPM; **T3-** Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (15 min); **T4-** Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (15 min)+ 1 ml.L⁻¹PPM; **T5-** Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (20 min); **T6-**Etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (20 min)+ 1 ml.L⁻¹PPM

4.2 MEIOS DE CULTURA NA INDUÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS E CONDIÇÕES DE CULTURA

4.2.1 Efeito do 2,4-D na indução da embriogênese somática

Após 10 dias da inoculação dos cotilédones *in vitro*, começou a formação de massas pró-embriogênicas (MPE) não diferenciadas. A formação dessas massas ocorreu de forma indireta (embriogênese somática indireta), já que houve formação intermediária de calos. Esses calos se formaram a partir do eixo embrionário (Figura 4-A). A indução da ES de forma indireta também foi reportada para outras Myrtaceae, como: *Psidium guajava* (NASIM, 2010) e *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990). A formação de embriões somáticos ocorreu de forma assincrônica, ou seja, em uma mesma MPE havia diferentes estádios de desenvolvimento dos ES formados (Figura 4-B). Outros autores também reportaram essa forma de desenvolvimento: em *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007) e *Psidium guajava* (NASIM, 2010).

FIGURA 4: FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ- EMBRIOGÊNICAS E EMBRIÕES SOMÁTICOS A PARTIR DE SEMENTES DE *Plinia cauliflora*: A) INÍCIO DA FORMAÇÃO DE MASSA PRÉ-EMBRIOGÊNICAS A PARTIR DO EIXO EMBRIONÁRIO (SETA); B) EMBRIÕES SOMÁTICOS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO. BARRA: 0,1 CM.



Para a indução da ES utilizou-se 2,4-D e a melhor concentração para a indução de MPE foi de 15 μM (70%) (Tabela 4). Porém, apesar da formação de MPE ser alta, a oxidação dessas massas também mostrou-se alta, com a maior taxa de oxidação (52,5%) nessa concentração de 15 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de 2,4D (Tabela 4, Anexos 4, 5, 6 e 7).

A oxidação foi menor quando se utilizou uma menor concentração de 2,4-D; porém, devido ao balanço entre citocininas e auxinas dentro dos tecidos (maior concentração de citocininas), houve uma maior taxa de germinação dos eixos embrionários (Tabela 4, Anexos 4, 5, 6 e 7). A contaminação foi de 5% em todos os tratamentos.

TABELA 4: GERMINAÇÃO, OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS EM CULTURAS DE COTILÉDONES DE JABUTICABEIRA, CONFORME CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D EM MEIO DE CULTURA MS, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*.

CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D (μM)	GERMINAÇÃO DO		
	EIXO EMBRIONÁRIO (%)	OXIDAÇÃO (%)	MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS (%)
5,0	62,5 a	17,5 b	5,0 b
10,0	17,5 b	32,5 b	20,0 b
15,0	2,5 b	52,5 a	70,0 a
CV(%)	44,90	38,91	42,71

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

No caso de outras espécies de Myrtaceae, o 2,4-D também foi utilizado para induzir a embriogênese somática em culturas de *Acca sellowiana* (CRUZ et al., 1990; CANHOTO e CRUZ, 1994; CANHOTO e CRUZ, 1996b; GUERRA et al., 2001), *Myrtus communis* (CANHOTO et al., 1999), *Psidium guajava*

(NASIM, 2010; BAJPAI et al., 2016) e *Myrciaria aureana* (MOTOIKE et al., 2007). Nesses estudos, as concentrações de 2,4-D variaram entre 2 e 20 μM , valores semelhantes aos testados neste trabalho.

No presente trabalho, 60 dias de exposição ao 2,4-D resultaram em embriões anormais (embriões fundidos e com a presença de mais de dois cotilédones) (Figura 6D). Esses resultados são semelhantes aos reportados por Pescador et al. (2008), onde elevada quantidade de embriões somáticos de *Acca sellowiana* com fenótipos alterados (76,3%) foram encontrados no 40º dia de cultura na presença de 2,4-D, ou seja, um elevado tempo de exposição a essa auxina pode causar alterações fenotípicas.

Para a indução da embriogênese somática, certas células diferenciadas adquirem competência embriogênica e, para que isso ocorra, as auxinas mediam a transição de células somáticas a embriogênicas, a partir da reprogramação de genes envolvidos na embriogênese (YANG e ZHANG, 2010). O 2,4-D é um composto sintético análogo às auxinas, comumente utilizado em protocolos de embriogênese somática para várias espécies (ISAH, 2016). De acordo com Guerra et al. (1999), na maioria dos modelos de embriogênese induzida, as auxinas, com destaque ao 2,4-D, são consideradas as substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação e rediferenciação, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes.

Considerando a alta taxa de oxidação, a seguir testou-se o carvão ativado, a fim de adsorver os compostos fenólicos liberados pelos tecidos da semente e reduzir a oxidação.

4.2.2. Efeito do 2,4-D e do carvão ativado na indução da embriogênese somática.

Quando o CA foi adicionado aos meios contendo 2,4-D, a embriogênese continuou de forma indireta, ou seja, houve formação de MPE e só depois diferenciação de ES nos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Porém, o tempo para o início da formação de MPE alterou-se de 10 dias na ausência de CA, para 20 dias quando adicionado o CA.

Estatisticamente comparando o fatorial de carvão ativado com concentrações de 2,4-D para a análise da oxidação, não houve interação significativa entre CA e 2,4D. Porém, quando analisados o carvão ativado e as concentrações de 2,4-D, separadamente, as médias foram significativas. Com isso, analisando os fatores individuais para a oxidação, à medida que a concentração de 2,4-D foi aumentando, a oxidação por sua vez também aumentou. Quando analisados as quantidades de CA, não houve diferenças significativas entre as médias de 1 e 2 g.L⁻¹ (Tabela 5, Anexos 8). Portanto, optou-se em usar a menor quantidade para reduzir custos.

Já para a formação de MPE, a interação entre os fatores (carvão x 2,4D) foi significativa. Com isso, a maior taxa de formação de MPE foi de 82,5% (Tabela 5, Anexos 9) em 300 µM 2,4 D e 1 g.L⁻¹ de CA (Figura 5- c). Esse valor de 82,5% não diferiu estatisticamente para a formação de MPE de 57,5% em 200 µM 2,4-D e 0,5 g.L⁻¹ (57,5%), porém na presença de 0,5 g.L⁻¹ de CA, a oxidação foi maior, portanto não recomenda-se essa concentração de CA (Figura 5- A-D).

Nota-se que, com o aumento da quantidade de carvão ativado, também é necessário aumentar a quantidade de 2,4-D no meio, uma vez que o carvão adsorve, além dos compostos fenólicos, os reguladores vegetais, assim como outros componentes do meio.

O carvão ativado é comumente usado na cultura de tecidos para escurecer os meios de cultivo e adsorver substâncias inibitórias ou tóxicas para os tecidos de plantas (MOSHKOV et al., 2008). Por exemplo, foi usado em todos os estádios da embriogênese somática de *Pinus taeda* para aumentar frequências de iniciação (PULLMAN e JOHNSON, 2002), melhorar o rendimento e a qualidade de embriões somáticos durante a maturação (CAPUANA e DEBERGH, 1997; CARAWAY e MERKLE, 1997; Llet al., 1997, 1998; GROLL et al., 2002; PULLMAN et al., 2005; LELU-WALTER et al., 2006) e mais frequentemente durante a germinação dos embriões somáticos (VOOKOVÁ e KORMUÁK, 2001; SALAJ et al., 2004; ANDRADE e MERKLE, 2005).

TABELA 5: OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS EM CULTURA DE SEMENTES DE *Plinia cauliflora*, CONFORME CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE CARVÃO ATIVADO, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO *IN VITRO*.

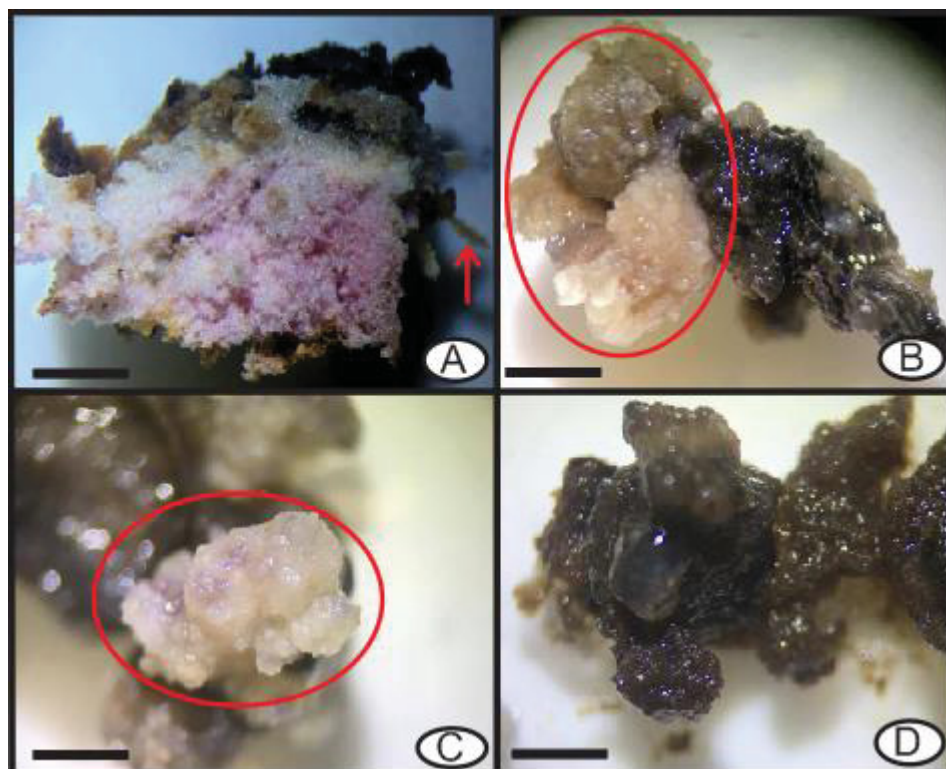
Carvão ativado (g.L ⁻¹)	Oxidação ^{ns} (%)					Massas Pró- Embriogênicas** (%)				
						2,4D (µM)				
	100	200	300	500	Médias	100	200	300	500	Médias
0,5	6,07	8,35	9,07	9,65	8,28 a	17,5 aB	57,5 aA	37,5 bAB	17,5 aB	5,17 a
1	2,23	2,25	2,43	5,66	3,39 b	17,5 aC	45,0 abAB	82,5 aA	30,0 aBC	6,06 a
2	1,41	2,64	3,25	5,81	3,28 b	20,0 aA	30,0 bA	47,5 bA	30,0 aA	5,07 a
Médias	3,24c	4,75b	4,9b	7,04 a		3,73 b	6,32a	7,23 a	4,45 b	
CV(%)	38,52					41,88				

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), pelo teste de Tukey.

^{ns}Não significativo ($p \geq 0,05$)

FIGURA 5: CULTURA DE SEMENTES DE *Plinia cauliflora*, 60 DIAS APÓS INTRODUÇÃO EM MEIO MS. (A) EXPLANTE COM FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS E RAÍZES (SETA) EM 100 μM DE 2,4-D E 1 g.L^{-1} CARVÃO ATIVADO; (B) INÍCIO DA FORMAÇÃO DE MASSA PRÉ-EMBRIOGÊNICA (CIRCULADO EM VERMELHO), EM MEIO CONTENDO 200 μM DE 2,4-D E 1 g.L^{-1} DE CARVÃO ATIVADO, (C) MASSAS PRÉ-EMBRIOGÊNICAS (CIRCULADO EM VERMELHO) NA PRESENÇA DE 300 μM DE 2,4-D E 1 g.L^{-1} DE CARVÃO ATIVADO; (D) EXPLANTE OXIDADO EM MEIO CONTENDO 500 μM 2,4-D E 0,5 g.L^{-1} DE CARVÃO ATIVADO. BARRA: 0,1 CM.



4.3 FASE I DA MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

Para o início da maturação, ou seja, maturação das massas pró-embriogênicas (MPE) no escuro (Figura 6A), o meio foi suplementado com CA (1 g.L^{-1}) e três concentrações de PEG 4000 (30, 60, 90 g.L^{-1}). Após 30 dias nesse meio, a maior parte dos ES encontrava-se em estágio de torpedos (Figura 6C). A maior porcentagem de ES nesse estágio (77,5%) foi obtida no tratamento com 30 g.L^{-1} PEG, porém não diferiu estatisticamente do valor obtido no meio com 60 g.L^{-1} (65%), podendo utilizar a menor quantidade

visando o menor gasto com PEG. Por sua vez, no caso da oxidação, não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 6, Anexos 10, 11, 12, 13).

A função do carvão ativado adicionado ao meio de cultura é adsorver substâncias tóxicas desse meio ou liberadas pelo tecido vegetal, mas ele também pode adsorver substâncias essenciais (vitaminas, sais minerais) para a formação e desenvolvimento da embriogênese somática, explicando assim a baixa formação de embriões em estágio de torpedo (20%), no meio com 1g.L^{-1} de CA (Tabela 6).

Como dito anteriormente, a formação dos embriões somáticos em *Plinia cauliflora* é assincrônica (Figura 6B e E), ou seja, em uma massa embriogênica há vários estádios de desenvolvimento dos embriões, podendo estar no estágio globular, cordiforme, torpedo ou até mesmo cotiledonar (Figura 6B, C e D). Para que a primeira fase da maturação seja bem-sucedida é preferível que os embriões somáticos estejam em estágio torpedo, uma vez que a partir desse estágio continua a maturação, na presença de luz.

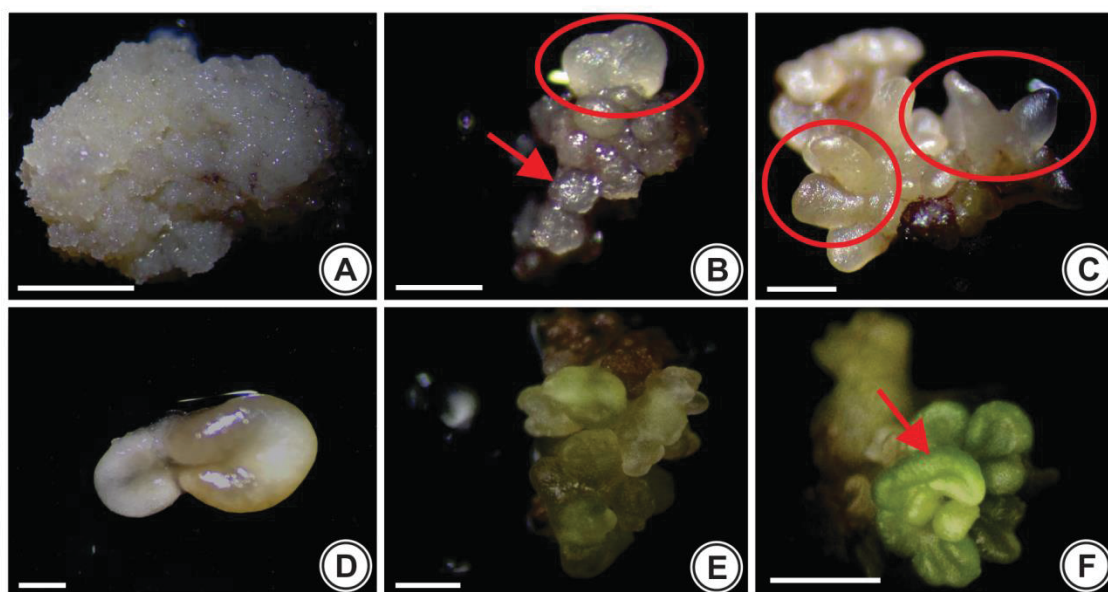
TABELA 6: EFEITO DO POLIETILENOGLICOL (PEG) E DO CARVÃO ATIVADO (CA) NA OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM SEMENTES DE JABUTICABEIRA CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS POR 30 DIAS.

Tratamento	Oxidação ^{ns} (%)	Estádio globular ** (%)	Estádio de torpedo** (%)	Estádio cotiledonar ^{ns} (%)
1 g.L^{-1} CA	2,5	50,0 a	20,0 c	1,0
30 g.L^{-1} PEG	5,0	18,5 b	77,5 a	3,05
60 g.L^{-1} PEG	12,0	20,0 b	65,0 ab	2,23
90 g.L^{-1} PEG	15,0	27,5 b	50,0 b	2,43
CV(%)	90,54	41,09	20,96	86,58

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. ^{ns}Não significativo ($p \geq 0,05$)

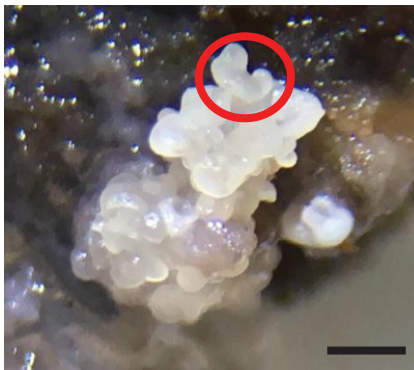
Nos seguintes testes realizados com *P. cauliflora* a formação de embriões em estágio de torpedo foi maior (77,5 e 65,0 %) nos meios contendo 30 e 60 g.L⁻¹ de PEG (Tabela 6). Norgaard (1997) reportou que a adição de PEG-4000 ao meio de cultura aumentou o rendimento de embriões somáticos de *Abies nordmanniana*. Heringer et al. (2013) testaram duas concentrações de PEG 4000 (30 e 60 g.L⁻¹) para a maturação de embriões somáticos de *Carica papaya*, e observaram que os tratamentos que utilizaram 60 g.L⁻¹ de PEG, foi o que apresentou a média mais alta para o número de embriões somáticos maturados. Bajpai et al. (2016) utilizaram PEG (50 mg.L⁻¹) para maturação de embriões somáticos de *Psidium guajava* e tiveram como resultado que 74,38% dos embriões somáticos se desenvolveram até o estágio cotiledonar.

FIGURA 6 - EMBRIÕES SOMÁTICOS, 30 DIAS APÓS TRANSFERÊNCIA DAS MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS PARA MEIOS DE MATURAÇÃO. (A) MASSA PRÓ-EMBRIOGÊNICA EM MULTIPLICAÇÃO; (B) INÍCIO DA FORMAÇÃO DE EMBRIÕES GLOBULARES (SETA) E EMBRIÕES CODIFORMES (CÍRCULO) NO MEIO DE CULTURA CONTENDO 30 g.L⁻¹ DE PEG; (C) FORMAÇÃO DE EMBRIÕES EM ESTÁDIO DE TORPEDO (CÍRCULOS) NO MEIO COM 60g.L⁻¹ DE PEG; (D) FORMAÇÃO DE EMBRIÕES COTILEDONARES FUNDIDOS EM MEIO COM 90g.L⁻¹ DE PEG; (E) MATURAÇÃO DE EMBRIÕES, SOB LUZ, ASSINCRONICOS; (F) EMBRIÕES COTILEDONARES FUSIONADOS, SOB LUZ. BARRA: 1 CM.



Os embriões em estágio de torpedo (Figura 7) foram transferidos para novos meios de cultura para os testes de maturação final.

FIGURA 7- MASSAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora* COM EMBRIÕES EM ESTÁDIO DE TORPEDO CIRCULADOS EM VERMELHO, EM MEIO DE CULTURA DE BASE ACRESCIDO DE PEG, POR 30 DIAS. BARRA: 0,1 CM.



4.4 FASE II DA MATUREZAÇÃO E CONVERSÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

4.4.1 Efeito do PEG e do carvão ativado

Comparando os resultados obtidos nos meios contendo CA (Figura 8A) ou PEG (30 g.L⁻¹) (Figura 8B), não se observa diferença estatística entre a média dos dois tratamentos, nem para a oxidação nem para a sobrevivência (Tabela 7, Anexos 14 e 15). Porém, não houve conversão dos embriões em plântulas, ou seja, aproximadamente 30% dos embriões mantiveram-se verdes na presença de luz (Figura 8A), mas não formaram plântulas após 60 dias.

TABELA 7: OXIDAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *P. cauliflora*, CULTIVADOS EM MEIO MS CONTENDO 1 g.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU 30 G.L⁻¹ DE PEG, SOB LUZ, APÓS 30 DIAS.

Tratamento	Oxidação^{ns} (%)	Sobrevivência^{ns} (%)
1 g.L⁻¹ carvão ativado	40,00	28,33
30 g.L⁻¹ PEG	51,66	31,66
CV(%)	19,53	26,70

ns: não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4.2 Efeito do Gelzan®

Quando testadas diferentes concentrações (2; 2,5 e 3 g.L⁻¹) de gelana (Gelzan®) observou-se que não houve diferença estatística entre as médias para a oxidação. Já para a sobrevivência, as maiores médias foram obtidas quando o meio foi suplementado com 2,5 ou 3 g.L⁻¹ de Gelzan® (Tabela 8, Anexo 16 e 17), porém não houve conversão dos embriões.

Alguns estudos mostraram que, assim como no presente estudo, a suplementação de meios de cultura com gelana (Phytigel®) na concentração adequada teve um efeito positivo no desenvolvimento e crescimento de embriões somáticos de algumas espécies de coníferas, efeito devido ao estresse osmótico causado pelo Phytigel® (GARIN et al., 2000; KLIMASZEWSKA et al., 2000; LELU-WALTER e PÂQUES 2009; TEYSSIER et al. 2011; MOREL et al., 2014).

Hazubska-Przybył et al. (2016) afirmaram que controlar a pressão osmótica do meio através da variação de concentrações de Phytigel® também afetou a acumulação de amido em embriões somáticos de espécies de *Picea* spp. Quando a concentração de Phytigel® aumentou de 4 para 8 g.L⁻¹, o processo de acumulação de amido foi inibido, justificando esse fato pela

dificuldade de absorção de sacarose com o aumento da pressão osmótica do meio de cultura.

TABELA 8: OXIDAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *P. cauliflora* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE GELZAN®, POR 30 DIAS.

Concentração de Gelzan® (g.L-1)	Sobrevivência (%)	Oxidação^{ns} (%)
2,0	11,66 b	51,66
2,5	18,33 ab	58,33
3,0	24,99 a	63,33
CV(%)	16,15	19,53

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ns: não significativo ($p \geq 0.05$)

4.4.3 Efeito da BAP

Quando os embriões foram cultivados em meio contendo três concentrações de BAP (2, 4, 8 μ M), a porcentagem de oxidação foi alta e superior a 50% (Tabela 9, Anexos 18 e 19). Quanto maior a concentração de BAP, maior foi a oxidação e menor a sobrevivência sendo a maior média de sobrevivência (23,33%) obtida no meio contendo 2 μ M de BAP.

Para mirtáceas, não há registros na literatura de testes de BAP isolado para a maturação de embriões somáticos, apenas combinados com outros reguladores.

TABELA 9: OXIDAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *P. CAULIFLORA* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE BAP POR 30 DIAS.

Concentração de BAP (μM)	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
2	23,33 a	59,99 b
4	13,33 ab	69,99 b
8	1,66 b	93,33 a
CV(%)	27,71	7,07

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

4.4.4 Efeito do GA_3 combinado com BAP

Para a conversão de embriões somáticos em plântulas, testou-se também duas concentrações de GA_3 (1 e 2 μM), combinado com 0,5 μM de BAP. Não houve diferenças significativas entre as médias de oxidação e sobrevivência (Tabela 10, Anexos 20 e 21). As médias de oxidação foram baixas, comparadas aos outros testes de maturação (Gelzan®, BAP) e a sobrevivência (embriões verdes) também foi baixa. Por não haver diferenças significativas entre os tratamentos, nota-se a necessidade da realização de outros testes com concentrações diferentes das testadas.

Em estudos realizados com embriões somáticos de *Acca sellowiana* no estágio torpedo e pré-cotiledonar provenientes de meio de indução contendo glicose, a maior taxa de conversão à plântula completa após 15 dias foi de 24,5%, em meio contendo 0,5 μM de BAP e 1 μM de GA_3 (CANGAHUALA-INOCENTE, 2007). Essas concentrações foram as mesmas que as testadas no experimento com *P. cauliflora*, porém não houve conversão em plântulas no presente trabalho.

Também é importante ressaltar que, visualmente, os embriões estavam com aspecto translucido (Figura 8E, 8F) e que também havia embriogênese

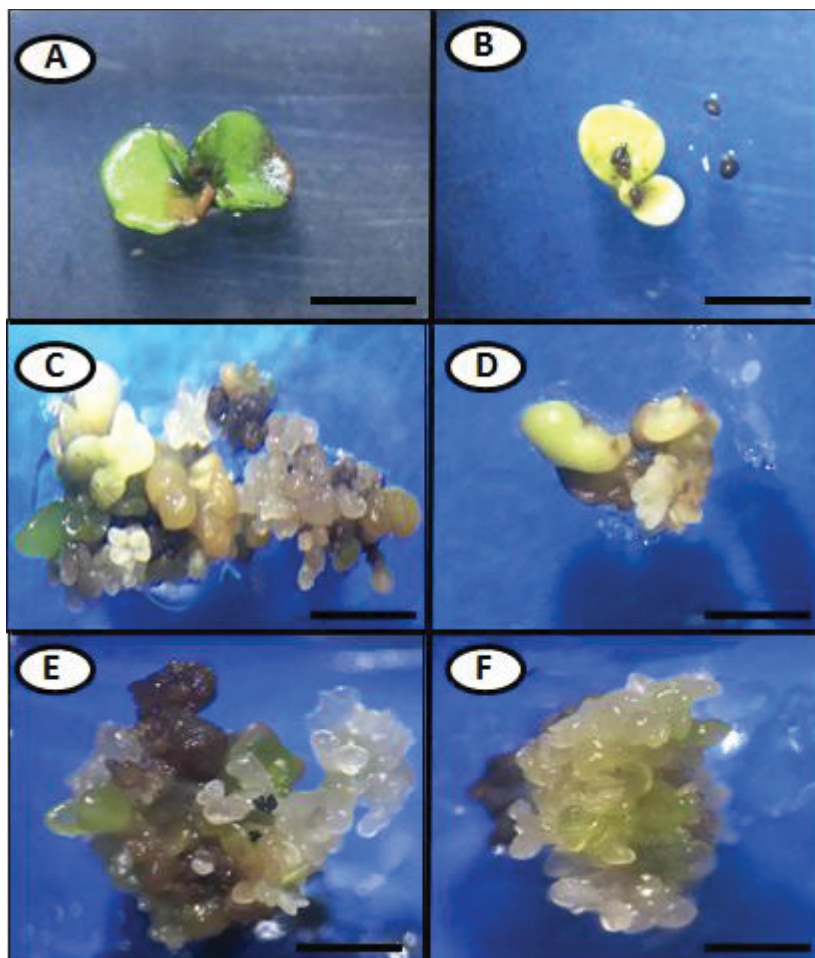
recorrente, o que indica que o 2,4-D presente no meio de cultura durante a fase de indução ainda afetava a embriogênese somática (Figura 8C, 8D e 8F).

Uma vez que as células embriogênicas são formadas, elas continuam a proliferar na forma de massas pró-embriogênicas (MPEs). Essas massas podem proliferar em meio de cultura semelhante ao utilizado para a iniciação das culturas (VON ARNOLD et al., 2002). Em algumas espécies, mesmo sem reguladores vegetais, as massas continuam a multiplicar-se. As auxinas tem efeito inibitório sobre a maturação e desenvolvimento dos estádios dos embriões somáticos; portanto, para maturação dos embriões é necessário transferir as massas para um meio de cultura sem auxinas (VON ARNOLD et al., 2002).

Durante a maturação, os embriões somáticos passam por diversas mudanças bioquímicas e morfológicas, semelhantes às modificações que ocorrem nos embriões zigóticos (MORAES et al., 2006). O acúmulo de produtos de reserva que ocorre durante a maturação é necessário para a subsequente germinação e conversão dos embriões somáticos em plântulas (VON ARNOLD et al., 2002). A síntese de proteínas e acúmulo de reservas está relacionada ao estresse hídrico (ZIMMERMAN, 1993).

Nos testes realizados, não houve a conversão dos embriões em plântulas, sendo justificado pelo fato dos embriões serem anormais (embriões fusionados e com a presença de mais de dois cotilédones), devido à exposição por tempo prolongado ao 2,4-D (60 dias).

FIGURA 8- MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora* E EMBRIOGÊNESE REPETITIVA, EM MEIO DE CULTURA DE MATURAÇÃO FASE II A) EMBRIÕES SOMÁTICOS EM ESTÁDIO COTILEDONAR, EM MEIO CONTENDO 1 g.L^{-1} DE CA; B) EMBRIÕES SOMÁTICOS, EM ESTÁDIO COTILEDONAR, EM MEIO CONTENDO 30 g.L^{-1} DE PEG, C) E D) MEIO CONTENDO $0,5 \mu\text{M}$ DE BAP E $1 \mu\text{M}$ DE GA_3 , E) E F) MEIO CONTENDO $0,5 \mu\text{M}$ DE BAP E $2 \mu\text{M}$ DE GA_3 . EVIDENCIANDO EM C) D) E) E F) A PRESENÇA DE EMBRIOGÊNESE RECORRENTE. APÓS 30 DIAS. BARRA: 1 CM.



Bajpai et al. (2016) também observaram embriogênese somática recorrente em *Psidium guajava* e concluíram que a formação repetitiva de embriões somáticos pode ser favorável a produção em larga escala e também para programas de melhoramento, referindo-se a clonagem de genótipos elite.

TABELA 10: OXIDAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MS ADICIONADO DE 1 E 2 μM DE GA_3 E 0,5 μM DE BAP POR 30 DIAS.

Concentração de GA_3 (μM)	Sobrevivência^{ns} (%)	Oxidação^{ns} (%)
1	5,66	2,46
2	6,38	1,82
CV(%)	11,99	59,67

ns: não significativo ($p \geq 0.05$)

Dois dias após a transferência para a luz, os embriões somáticos em estágio cotiledonar adquiriam coloração esverdeada (Figura 8-A). Porém, após 30 dias, nenhum dos embriões apresentou emissão da radícula e parte aérea. Os embriões foram transferidos para meio fresco a cada mês, mas mesmo após 60 dias, não apresentaram qualquer sinal de germinação ou conversão, mantendo-se verdes por todo o período.

4.5 ANÁLISES ANATÔMICAS DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS

Durante a fase de indução, nota-se a formação das massas pró-embriogênicas, com uma zona de separação (cicatrização) entre o explante e as massas pró-embriogênicas (Figura 9A). Essa zona de cicatrização pode ser devida ao estresse causado pela alta concentração ao 2,4-D e também pelo tempo de permanência dos tecidos no meio contendo este regulador (60 dias), ocorrendo a cicatrização como reação ao excesso da auxina sintética. Segundo Santos et al. (2008), a diferenciação de um tecido de cicatrização em clones de eucalipto submetidos ao glifosato funciona como uma barreira que previne o progresso da necrose para outras regiões da folha. A formação do tecido de

cicatrização é resultante da capacidade das plantas de formar novos tecidos a partir de células parenquimáticas (DICKISON, 2000).

Trabalhos com ES em *A. sellowiana* mostraram que houve alterações histológicas associadas à aquisição da competência embriogênica, indicando a importância da realização de estudos histológicos (CANHOTO e CRUZ, 1996; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004).

Nos testes histoquímicos realizados com *P. cauliflora* também é possível visualizar que, em áreas de morte celular ou na zona de cicatrização, há compostos fenólicos, corados em azul escuro (Figura 9A, C e I). Estudos demonstram que estresses bióticos e abióticos podem induzir o acúmulo de fenóis nas células das plantas (SANTOS et al., 2006, SANTOS e AZEVEDO, 2007).

Nas massas pró-embriogênicas cultivadas em meio de cultura sem carvão ativado (Figura 9B), observou-se divisão celular, porém essas células são vacuolizadas e não há formação de células densas meristemáticas, também não há elementos de vaso (xilema). Quando essas massas pró-embriogênicas estavam em meio de cultura com carvão ativado, embriões começaram a se formar, com um procâmbio sem o espessamento e desenvolvimento das paredes das células do xilema (Figura 9C e D).

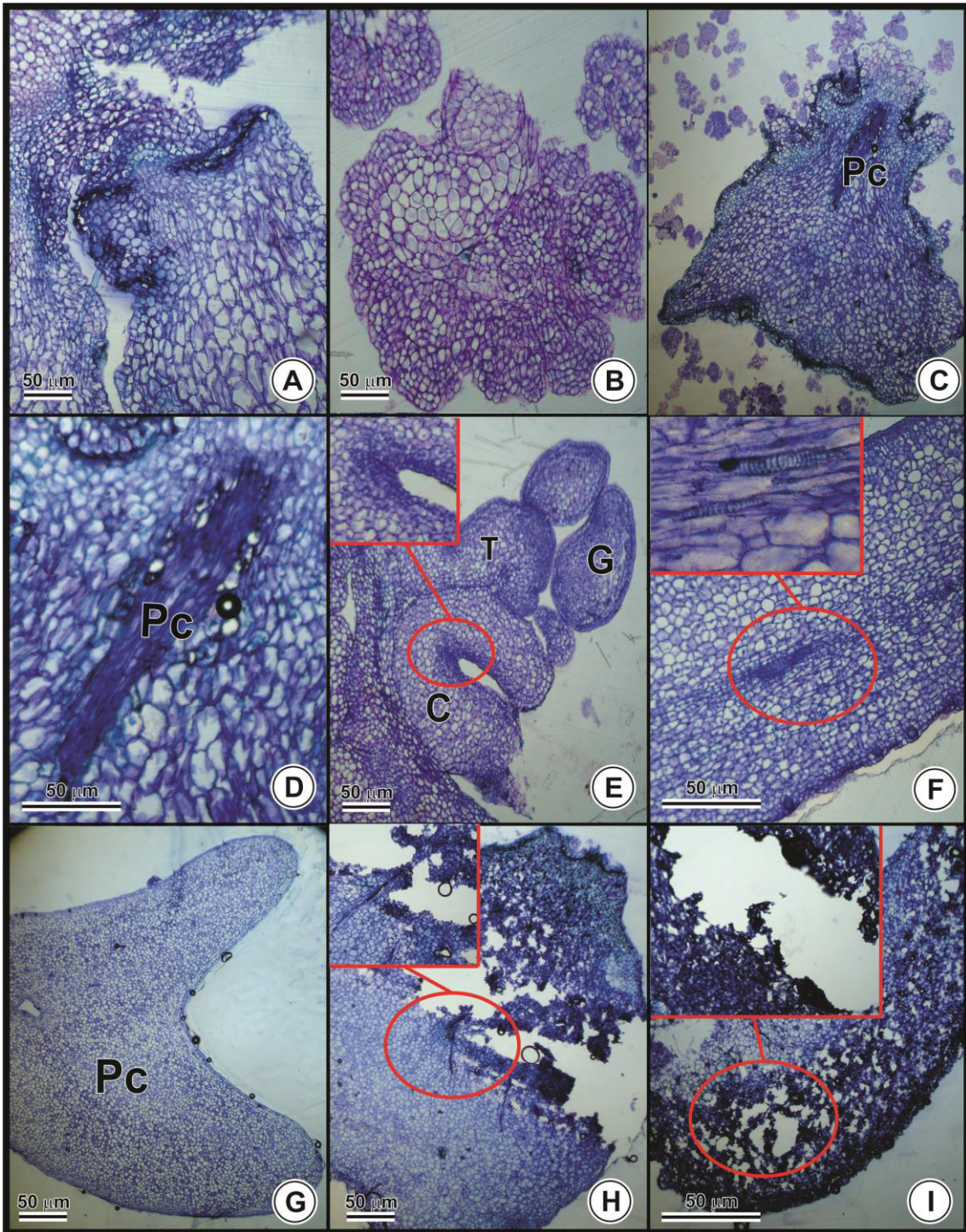
Semelhantes ao encontrado no presente estudo em experimentos de indução de massas pró embriogênicas em meio contendo CA e 2,4-D, em análises anatômicas dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*, Fraga et al. (2012) observaram, durante a fase de formação dos embriões somáticos globulares, formações meristemáticas densas, com alta divisão celular.

Como citado anteriormente, a formação dos embriões somáticos de *P. cauliflora*, durante a fase I da maturação, ocorre de forma assíncrona, ou seja, há diversos estádios de desenvolvimento (globular, torpedo, cotiledonar) ao mesmo tempo durante as fases de desenvolvimento (Figura 9E).

Na fase de maturação, os embriões sobreviveram e tinham um sistema vascular diferenciado, com espessamento da parede das células do xilema (Figura 9F), porém a formação do meristema apical foi interrompido por uma zona de cicatrização fenólica, como mostrado no detalhe da figura 9E. Na fase globular (Figura 9G), o procâmbio se formou, assim como a epiderme bem definida. Quando o embrião avançou ao estádio cotiledonar, os elementos de

vaso (xilema) estavam presentes, mas o xilema era interrompido por morte celular e com zona de cicatrização (presença de compostos fenólicos), conforme Figuras 9H e 9I.

FIGURA 9: CORTES ANATÔMICOS EM EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora* (A) FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS A PARTIR DE SEMENTES DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS. (B) FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS, EM MEIO COM 2,4 D, SEM A PRESENÇA DE CARVÃO ATIVADO. (C) FORMAÇÃO DE MASSAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS EM MEIO COM 2,4 D, NA PRESENÇA DE CARVÃO ATIVADO. (D) DETALHE DA FOTO C, ONDE Pc= PROCÂMBIO (E) EMBRIÕES SOMÁTICOS EM MATURAÇÃO FASE I, EM DIVERSOS ESTÁDIOS (ASSINCRÔNICO), ONDE G= GLOBULAR, T= TORPEDO, C= COTILEDONAR, ONDE O DETALHE DESTACA UMA ZONA DE CICATRIZAÇÃO NO MERISTEMA APICAL. (F) EMBRIÃO SOMÁTICO NO ESTÁDIO GLOBULAR, COM O INÍCIO DA DIFERENCIAÇÃO DO XILEMA EM DETALHE. (G) EMBRIÃO SOMÁTICO EM FASE DE MATURAÇÃO NO ESTÁDIO TORPEDO, ONDE Pc= PROCÂMBIO. (H e I) EMBRIÕES SOMÁTICOS EM FASE DE MATURAÇÃO NO ESTÁDIO COTILEDONAR, ONDE OS DETALHES EVIDENCIAM ZONAS DE CICATRIZAÇÃO E MORTE CELULAR NA REGIÃO DOS ELEMENTOSVASCULARES.



5. CONCLUSÕES

Com os testes realizados, foi possível obter embriões somáticos de *P. cauliflora* até o estágio cotiledonar, mas estes embriões cotiledonares eram anormais. O melhor tratamento de desinfestação das sementes é em etanol 70% (1 min) + NaClO 5% (10 min)+ 1 ml.L⁻¹ PPM no meio de cultivo e, para induzir massas pró-embriogênicas, se utiliza o meio de cultura MS, suplementado com 2,4-D (300 µM) e 1 g.L⁻¹ de carvão ativado. Para a fase I da maturação, a adição de 30 g.L⁻¹ de PEG ao meio de cultura permite obter embriões somáticos em estágio de torpedo e cotiledonar, enquanto os tratamentos de maturação não resultam na conversão dos embriões em plântulas.

Os estudos da anatomia mostraram a reação das células ao tempo de exposição e às concentrações de 2,4-D, resultando em zonas de cicatrização com acúmulo de compostos fenólicos e morte celular.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos realizados foram importantes para mostrar que a alta exposição à auxina sintética (2,4-D) na fase de indução, apesar da formação de embriões, foi prejudicial às células uma vez que os embriões formados foram anormais e mostraram zonas de cicatrização com a presença de compostos fenólicos.

São necessários outros experimentos na fase de indução visando diminuir o tempo de exposição a esta auxina para definir as condições que levam à maturação dos embriões somáticos e a sua conversão em plântulas.

É importante ressaltar que o trabalho é o início do desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática de uma espécie lenhosa nativa (*Plinia cauliflora*), que apresenta dificuldades para propagação, e que não há relatos na literatura de protocolos para esta espécie.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. C. S. C. **Organogênese in vitro na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. Brasil: Universidade Federal de Viçosa, Tese de doutorado em **Ciência Florestal**, 2001.
- ANDERSEN, O.; GOMES, F.R. Propagação vegetativa da jaboticabeira (*Myrciaria* sp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1976. v.2, p.423-427, 1976.
- ANDRADE, G.M.; MERKLE, S.A. Enhancement of American chestnut somatic seedling production. **Plant Cell Reports**, v. 24, p.326-334, 2005.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV. p.438, 2003.
- 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.
- BALERDI, C.F.; RAFIE, R.; CRANE, J. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*, Berg.): a delicious fruit with an excellent market potential. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.119, p.66-68, 2006.
- BANDEIRA, F.S. **Cultivo in vitro e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges**. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Curso de Pós-graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, MG, 92 p., 2008.
- BONGA, J. M.; ADERKAS, P. V. **In vitro culture of trees**. Kluwer Academic Publishers: 57.1992.
- BOOZ M. R., PESCADOR R. Efeito do ácido γ - aminobutírico (Gaba) na embriogênese somática de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências** p.198-200. 2007.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER, D.; TORRES, A.C.; GUERRA, M.P. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Accasellowiana* (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**, v.111, p.228-234, 2007.
- CANHOTO, J. M.; CRUZ, G. S. *Feijo sellowiana* Berg (*Pineapple guava*). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry 35. **Trees IV**. New Delhi: Springer, p. 155-171, 1996a.
- 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.

CAPUANA, M.; DEBERGH, P.C. Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, p. 23-29, 1997.

CARAWAY, D.T.; MERKLE, S.A. Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. **Canadian Journal Research**, p.1805-1812, 1997.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N.W. **Embriogênese Somática**. DOCUMENTO 152- EMBRAPA. ISSN 0103-0205 Setembro, 2006.

CASAGRANDE JÚNIOR, J.G.; DUTRA, L.F.; TONIETTO, A.; NACHTIGAL, J.C. Efeito do estiolamento de ramos e do AIB no enraizamento de estacas herbáceas de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, n.1, p.24-26, 2000.

CASTELLA, P.R.; BRITEZ, R.M.A (Orgs.). **Floresta com Araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 233p., 2004.

CASTRO, P. R. C; VIEIRA, E. L. **Aplicação de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Editora Agropecuária: 132, 2001.

CORREDOIRA E, BALLESTER A, VIEITEZ FJ. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. **Tree Physiology**, p.678–690. 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.

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 jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 246-252, 2011a.
- DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SACHET, M.R.; MALAGI, G. Modo De Reprodução E Viabilidade Do Pólen De Três Espécies De Jaboticabeira. **Revista Brasileira Fruticultura**. [online]. Vol.33, n.2, p. 345-352. Jaboticabal- SP, Jun. 2011b.
- DANNER, M.A.; CITADIN, I.; SASSO, S.A.Z.; SCARIOT, S.; BENIN, G. Genetic dissimilarity among jaboticaba trees native to South western Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.2, p.517-525, 2011c.
- DANNER, M.A.; CITADIN, I.; SASSO, S.A.Z.; TOMAZONI, J.C. Diagnóstico ecogeográfico da ocorrência de jaboticabeiras nativas no Sudoeste do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.3, p.746-753, 2010.
- DICKSON, W.C. Integrative Plant Anatomy. **Academic Press**, San Diego, 533 p, 2000.
- DUARTE, O.; HUETE, M.; LÜDDERS, S.P. Propagation of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg.) by terminal leafy cuttings. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.452, p.123-128, 1997.
- FÉHER, A.; PASTERNAK, T.A.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to embryogenic state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.74, p. 201-228, 2003.
- FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.13, p.1992-2001, 2007.
- 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.
- GARIN, E.; BERNIER-CARDOU, M.; ISABEL, N.; KLIMASZEWSKA, K.; PLOURDE, A. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p.27–37, 2000.
- GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture – **The Technology**. 2^a ed. England: Exegetics, 1:575, 1993.

GOLLE, D.P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** Brasil: Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium*.** Brasil: Universidade São Paulo, Ph.D., 2002.

GROLL, J.; GRAY, V.M.; MYCOCK, D.J. Development of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) somatic embryos during culture with abscisic acid and activated charcoal. **Journal of Plant Physiology**, p. 437-443, 2002.

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.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.), **Cultura de tecidos e transformação genética em plantas**, v. 2, Brasília: EMBRAPA-SPI, p.533-568, 1999.

HAZUBSKA-PRZYBYŁ, T.; KALEMBA, P. E.; RATAJCZAK, E.; BOJARCZUK, K. Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos. **Acta Physiologia e Plantarum**, v.38, p. 59-73, 2016.

HERINGER, A. S.; VALE, E. ; BARROSO, T.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, vol.25 no.2 , 2013.

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

JENIK, P.D.; BARTON, M.K. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. **Development**, v. 132, p. 3577-3585, 2005.

JIMÉNEZ, V.M..Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p. 196–223, 2001.

KLIMASZEWSKA, K.; CARDOU, M.B.; CYR, D.R.; SUTTON, B.C.S. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, p.279–286, 2000.

LEITE-LEGATTI, A.V.; BATISTA, A.G.; DRAGANO, N.R.V.; MARQUES, A.C.; MALTA, L.G.; RICCIO, M.F.; EBERLIN, M.N.; MACHADO, A.R.T.; CARVALHO-SILVA, L.B.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M.; MARÓSTICA

JÚNIOR, M.R. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v.49, p.596-603, 2012.

LELU-WALTER, M.A.; BERNIER-CARDOU, M.; KLIMASZEWSKA, K. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). **Plant Cell Reports**, v. 25, p.767-776, 2006.

LELU-WALTER, M.A.; PÂQUES, L.E. **Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinii*)**. Perspectives for breeding, p.66-104, 2009.

LENQUISTE, S. A.; BATISTA, Â. G.; MARINELI, R. da S.; DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v.49, p.153-160, 2012.

LEONEL, S. et al. Efeito da aplicação de fitorreguladores e ácido bórico em estacas de jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.13, n.3, p.219- 222, 1991.

LI, X.Y.; HUANG, F.H.; GBUR, E.E. Polyethylene glycol promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.33, p.184-189,1997.

LORENZI, H.; B., L.; L., M. e SARTORI, S. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas**. São Paulo, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

MACHADO, A. M. R.; SANTIAGO, M. C. P. A.; BORGUINI, R. G.; GODOY, R. L. O.; GOUVÊA, A. C. M. S.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L. S. M. MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; FINGER, F.L. Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v.66, n.1-2, p.17-22, 2013.

MATTOS, João Rodrigues. **Frutíferas nativas do Brasil: jaboticabeiras**. Porto Alegre: Nobel, 1983. 92p.

MENGARDA, L. H. G.; PESCARDO, R.; CHU, E. P. E FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. DE C. L. Efeito do frio sobre os carboidratos solúveis em culturas embriogênicas de *Acca sellowiana* O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira Botânica**, v. 32, n. 2, p. 307-317, 2009.

MICHELUZZI, F.C. **Estudo da organogênese in vitro de explantes foliares de macieira (*Malus domestica* Borkh) Cv. Galaxy**. Brasil:Universidade Federal de Florianópolis. 2007.

MORAES, F. M. S. **Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea catharinensis* MEZ (Lauraceae)**. Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Biologia Molecular- Universidade de Brasília, 94p., 2006.

MOREIRA, C. dos S. **Frequência de híbridos em citro (*Citrus spp.*) em relação ao grau de poliembrionia**. Dissertação de mestrado apresentado à faculdade de Cruz das Almas: UFBA, 78p., 1996.

MOREL, A.; TEYSSIER, C.; TRONTIN, J.F.; ELIAŠOVA, K.; PESĚEK, B.; BEAUFOUR, M.; MORABITO, D.; BOIZOT, N.; LE METTE, C.; BELAL-BESSAI, L.; REYMOND, I.; HARVENGT, L.; CADENE, M.; CORBINEAU, F.; VA'GNER, M.; LABEL, P.; LELUWALTER, M.A. Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. **Physiologia Plantarum**, p.184–201, 2014.

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 EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds). *Plant propagation by tissue culture*, 3rd edn, The background. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 227-282, 2008.

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.

MUNHOZ, P. C.; PEREIRA, E.; SCHIAVON, Marina V.; SANTOS, D. C. dos; VIZZOTTO, M. **Caracterização química de frutas nativas vermelhas: araçá vermelho, cereja-do rio-grande, pitanga e jabuticaba**. In: ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 6., 2014, Pelotas. Palestras e resumos... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 189 p., 2014.

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.

NASIM, A. 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

NORGAARD, J.V. Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. **Plant Science**, p. 211–221, 1997.

PEREIRA, M. et al. Efeitos de substratos, valores de pH, concentrações de AIB no enraizamento de estacas apicais de jabuticabeira [*Myrciaria jabuticaba* (Vell) O.Berg.]. **ScientiaFlorestalis**, Piracicaba, n.69, p.84-92, 2005.

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

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito, fotoperíodo e temperatura no

estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.1, p.1-5, 2007.

PULLMAN, G.S.; GUPTA, P.K.; TIMMIS, R.; CARPENTER, C.; KREITINGER, M.; WELTY, E. Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. **Plant Cell Reports**, p. 271-279, 2005.

PULLMAN, G.S.; JOHNSON, S. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. **Annals of Forest Science**, p. 663-668, 2002.

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 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. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 129-133, 2007.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.2, n.3-4, p.159-167, 2004.

SALAJ, T.; MATÚŠOVÁ, R.; SALAJ, J. The effect of carbohydrates and polyethylene glycol on somatic embryo maturation in hybrid fir *Abies alba* × *Abies numidica*. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, p.159-167, 2004.

SANTOS, B. F. S.; AZEVEDO, A. A. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 5, n.1, p. 48-50, 2007.

SANTOS, B. F. S.; SILVA, L. C.; AZEVEDO, A. A.; ARAÚJO, J. M.; ALVES, E. F.; SILVA, E. A. M.; AGUIAR, R. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 158-168, 2006.

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, 2010a.

SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M.A. Propagação de jabuticabeira por enxertia e alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.2, p.571-576, 2010b.

- SASSO, S.A.Z. **Propagação vegetativa de jaboticabeira**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2009.
- SCARPARE FILHO, J.A. et al. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de jaboticabeira Sabará (*Myrciaria jaboticaba*) em condições de nebulização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.146-149,1999.
- SCARPARE, F.V. et al. Propagação da jaboticabeira 'Sabará' (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg.) através de estacas caulinares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DEFRUTICULTURA, 17. 2002, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002.
- SOUZA, J.A.;SCHUCH, M. W. ; SILVA, L. C. da ; SOARES, G. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Científica Rural**, Bagé, v.11, n.1, p.39-44, 2006a.
- SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta-matriz no estabelecimento *in vitro* do araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1920-1922, 2006b.
- SUGUINO, E.; MARTINS, A. N.; TURCO, P. H. N.; CIVIDANES, T. M. dos S.; FARIA, A. M.. **A cultura da jaboticabeira**. Pesquisa e Tecnologia: Apta Reginal. 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª Ed. Artmed: 677. 2006.
- TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v.55, n.4, p.297-304, 2008.
- TEYSSIER, C.; GRONDIN, C.; BONHOMME, L.; LOMENECH, A.M.; VALLANCE, M.; MORABITO, D.; LABEL, P.; LELU-WALTER, A.M. Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepsis*): a 2-DE proteomic analysis. **Physiologia Plantarum**, p.156–165, 2011.
- 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.
- VICIENT, C. M.; MARTINEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.10, v.1, p.1-12, 1998.
- VILLALOBOS, A.; THORPE, T. A. **Micropropagación: conceptos, metodología y resultados**. In: Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Ed. Cali: 127-141, 1991.

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.

VOOKOVÁ, B.; KORMUT'ÁK, A. Effect of sucrose concentration, charcoal, and indole-3 butyric acid on germination of *Abies numidica* somatic embryos. **Biologia Plantarum**, p.181-184, 2001.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: principios e técnicas**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 272 p., 2009.

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

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

ANEXOS

Anexo 1: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR OXIDAÇÃO NO EFEITO DOS 5 TRATAMENTOS DE TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES E FRUTOS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	299.83480	74.95870	33.7343 **
Resíduo	45	99.99144	2.22203	
Total	49	399.82624		

CV(%): 22.34

** 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 2: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR CONTAMINAÇÃO NO EFEITO DOS 6 TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	5	568.04039	113.60808	46.1570 **
Resíduo	54	132.91251	2.46134	
Total	59	700.95290		

CV(%): 31.28

** 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: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR OXIDAÇÃO NO EFEITO DOS 6 TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	5	415.26235	83.05247	22.7027 **
Resíduo	54	197.54596	3.65826	
Total	54	612.80831		

CV(%): 37.67

** 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 4: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR GERMINAÇÃO DO EIXO EMBRIONÁRIO NO EFEITO DAS 3 CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	217.15102	108.57551	29.9222 **
Resíduo	27	97.97193	3.62859	
Total	29	315.12295		

CV(%): 44.90

** 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 5: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR OXIDAÇÃO NO EFEITO DAS 3 CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	64.67582	32.33791	7.3515 **
Resíduo	27	118.76869	4.39884	
Total	29	118.76869		

CV(%): 38.91

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$)

Anexo 6: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR CONTAMINAÇÃO NO EFEITO DAS 3 CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	0.00000	0.00000	0.0000 **
Resíduo	27	80.64943	2.98702	
Total	29	80.64943		

CV(%): 94.97

** 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 7: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE MASSAS PRÉ EMBRIOGÊNICAS NO EFEITO DAS 3 CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	219.95139	327.15582	27.6980 **
Resíduo	27	107.20443	3.97053	
Total	29	327.15582		

CV(%): 42.71

** 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 8: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR OXIDAÇÃO NO EFEITO DO FATORIAL CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D X CONCENTRAÇÕES DE CARVÃO ATIVADO NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
CARVÃO ATIVADO	2	653.26277	326.63138	87.1296 **
(CA)				
2,4-D	3	220.65191	73.55064	19.6198 **
CA X 2,4-D	6	31.15502	5.19250	1.3851 ns
Tratamento	11	905.06970	82.27906	21.9481 **
Resíduo	108	404.87051	3.74880	
Total	119	1309.94021		

CV(%): 38.82

** 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 9: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE MASSAS PRÉ EMBRIOGÊNICAS NO EFEITO DO FATORIAL CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D X CONCENTRAÇÕES DE CARVÃO ATIVADO NA INDUÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
CARVÃO ATIVADO (CA)	2	23.68859	11.84429	2.2869 ns
2,4-D	3	236.53322	78.84441	15.2235 **
CA X 2,4-D	6	81.34333	13.55722	2.6177 *
Tratamento	11	341.56514	31.05138	5.9955 **
Resíduo	108	559.34454	5.17912	
Total	119	900.90968		

CV(%): 41.88

** 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 10: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR OXIDAÇÃO NO EFEITO DE PEG E CARVÃO ATIVADO PARA A PRÉ MATURAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	5.04059	1.68020	0.5000 ns
Resíduo	36	120.97415	3.36039	
Total	39	120.97415		

CV(%):90.54

** 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 11: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS ATÉ O ESTÁDIO GLOBULAR NO EFEITO DE PEG E CARVÃO ATIVADO PARA A PRÉ MATURAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	55.25224	18.41741	4.1554 *
Resíduo	36	159.55835	4.43218	
Total	39	214.81059		

CV(%):41.09

** 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 12: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS ATÉ O ESTÁDIO TORPEDO NO EFEITO DE PEG E CARVÃO ATIVADO PARA A PRÉ MATURAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	129.43691	43.14564	20.0629 **
Resíduo	36	77.41868	2.15052	
Total	39	206.85559		

CV(%): 20.96

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$)

Anexo 13: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS ATÉ O ESTÁDIO COTILEDONAR NO EFEITO DE PEG E CARVÃO ATIVADO PARA A PRÉ MATURAÇÃO DE CULTURAS EMBRIOGÊNICAS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	22.15396	7.38465	2.0762 ns
Resíduo	36	128.04807	3.55689	
Total	39	150.20203		

CV(%):86.58

** 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 14: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR OXIDAÇÃO NO EFEITO DE PEG E CARVÃO ATIVADO PARA A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	1.71541	1.71541	0.9933 ns
Resíduo	8	13.81626	1.72703	
Total	9	15.53167		

CV(%):19.53

** 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 15: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR SOBREVIVÊNCIA NO EFEITO DE PEG E CARVÃO ATIVADO PARA A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	0.23114	0.23114	0.1107 ns
Resíduo	8	16.71110	2.08889	
Total	9	16.94223		

CV(%):26.70

** 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 16: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR OXIDAÇÃO NO EFEITO DE GELZAN® PARA A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	1.71541	1.71541	0.9933 ns
Resíduo	8	13.81626	1.72703	
Total	9	15.53167		

CV(%):19.53

** 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 17: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR SOBREVIVÊNCIA NO EFEITO DE GELZAN® PARA A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	0.23114	0.23114	0.1107 ns
Resíduo	8	16.71110	2.08889	
Total	9	16.94223		

CV(%):16.15

** 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 18: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR OXIDAÇÃO NO EFEITO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE GA₃ PARA A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	1.02552	1.02552	0.6277 ns
Resíduo	8	13.07112	1.63389	
Total	9	14.09665		

CV(%):59.67

** 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 19: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR SOBREVIVÊNCIA NO EFEITO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE GA₃ PARA A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	1.30417	1.30417	2.5013 ns
Resíduo	8	4.17115	0.52139	
Total	9	5.47532		

CV(%):11.99

** 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 20: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR OXIDAÇÃO NO EFEITO DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP PARA A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	9.64725	4.82362	12.9464 **
Resíduo	12	4.47102	0.37259	
Total	14	14.11827		

CV(%): 7.07

** 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 21: RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO FATOR SOBREVIVÊNCIA NO EFEITO DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE BAP PARA A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Plinia cauliflora*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	2	31.27883	15.63942	21.3059 **
Resíduo	12	8.80848	0.73404	
Total	14	40.08732		

CV(%): 25.71

** 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 ($p \geq 0.05$).