

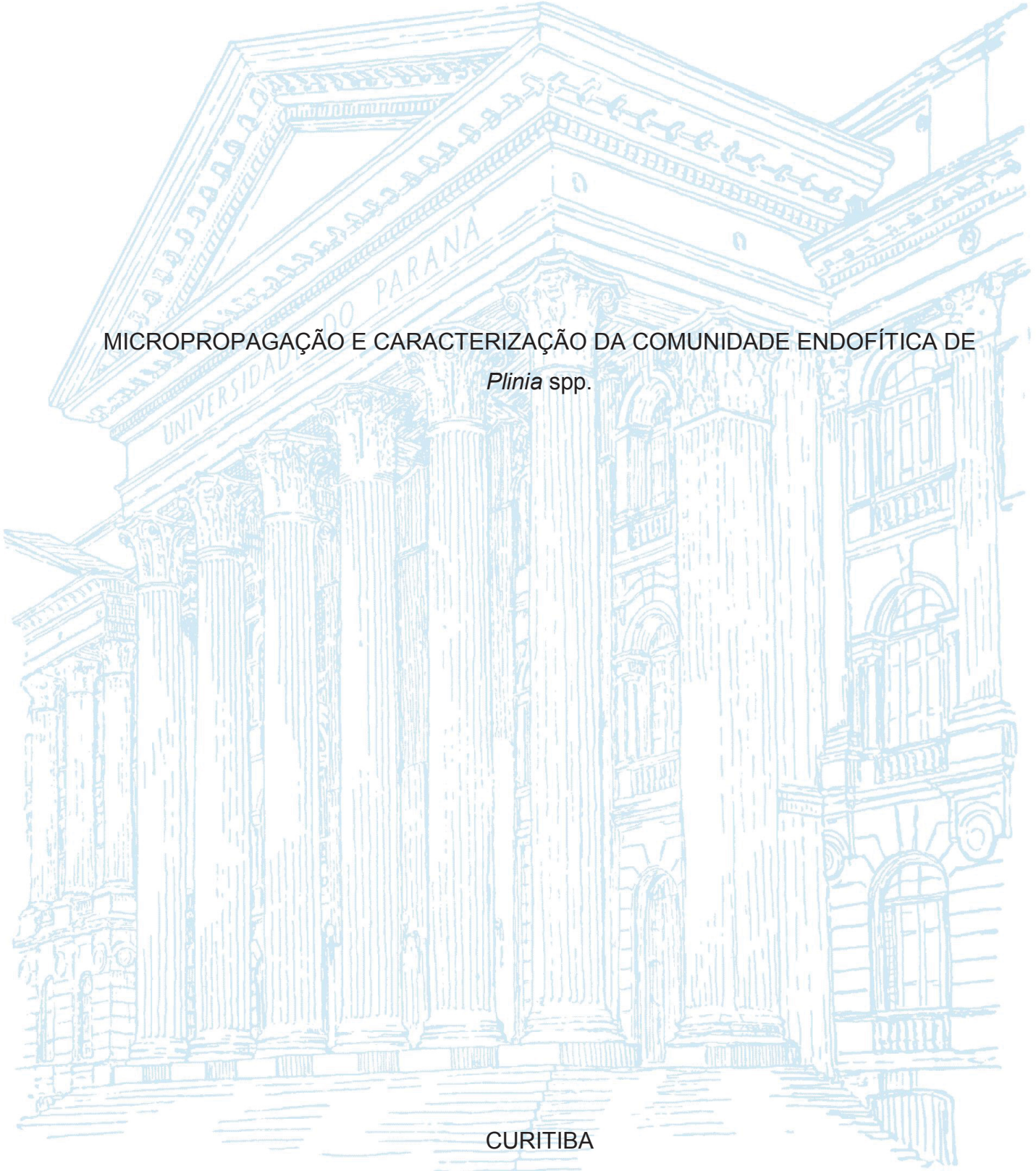
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDER GONÇALVES QUEIROZ

MICROPROPAGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE ENDOFÍTICA DE
Plinia spp.

CURITIBA

2019



EDER GONÇALVES QUEIROZ

MICROPROPAGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE ENDOFÍTICA DE
Plinia spp.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof. Dr^a. Marguerite Germaine Ghislaine Quirin.

Coorientadores: Dr^a. Juliana Degenhardt-Goldbach e Dr^a. Krisle da Silva

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Queiroz, Eder Gonçalves

Micropropagação e caracterização da comunidade endofítica de *Plinia*
spp. / Eder Gonçalves Queiroz. – Curitiba, 2019.
89 p.: il.

Orientador: Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Coorientadoras: Juliana Degenhardt-Goldbach e Krisle da Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Jaboticaba 2. Bactérias 3. Plantas – Propagação in vitro 4. I. Título
II. Quoirin, Marguerite Germaine Ghislaine, 1948- III. Goldbach, Juliana
Degenhardt IV. Silva, Krisle IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

CDD (20. ed.) 583.765

TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Botânica



Micropropagação e caracterização da comunidade endofítica de *Plinia* spp.

por

Eder Gonçalves Queiroz

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos doutores

Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin

Luciana Lopes Fortes Ribas

Glaciela Kaschuk

Curitiba, 26 de setembro de 2019.

À minha amada filha Olívia.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, pela qual tenho grande admiração, Professora Marguerite Quoirin. Agradeço pela orientação respeitosa, enaltecadora e valorizadora, pelo profissionalismo, o qual levarei como espelho, pela confiança e por ter sido sempre compreensível.

Às minhas coorientadoras Juliana Degenhardt e Krisle da Silva, pela orientação, pela grande contribuição com ideias, por terem me recebido cortesmente em seus laboratórios e disponibilizado prontamente todo o material que precisei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, em especial aos Professores da área da Fisiologia Vegetal, pelas aulas ministradas com maestria, pelo conhecimento e exemplo.

A todos do Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica. Agradeço aos colegas da iniciação científica, aos queridos companheiros de mestrado Fabrícia, Jackeline, Jean, Julio, Joana, Pamela e Quezia pela amizade, ajuda, conselhos e risadas.

A todos os colegas estagiários, técnicos laboratoriais e pesquisadores do Laboratório de Microbiologia do Solo e Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Florestas, pelo companheirismo, ajuda e pelas conversas descontraídas.

À analista Luziane Franciscon pela grande contribuição nas análises estatísticas do capítulo 1, por ter sido sempre muito solícita.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Florestas pela disponibilização de estrutura e recursos laboratoriais para a pesquisa sobre as bactérias.

À Universidade Federal do Paraná, pela estrutura, por estimular a pesquisa científica e por ser minha segunda casa desde a graduação.

À minha família, pelo apoio, amor e por ser meu porto seguro.

À minha filha Olívia, por ser o maior incentivo na minha busca pelo meu aprimoramento pessoal e profissional.

Agradeço em especial à minha amada esposa Camila Menegusso, que me deu todo o suporte necessário fora dos laboratórios, pelo incentivo constante, por me ouvir, pelos conselhos e por todo amor e carinho, sem você nada disso seria possível.

Obrigado!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos desenvolver um protocolo de micropropagação por multiplicação de gemas axilares para as espécies de jabuticabeira *Plinia peruviana*, *Plinia cauliflora* var. paulista e var. sabará iniciando pelo estabelecimento de um protocolo de germinação de sementes *in vitro*; investigar a comunidade endofítica associada a tecidos cultivados *in vitro* e folhas de plantas *in situ* de *Plinia peruviana*. Foi estudado o efeito dos meios de cultura WPM, WPM/2, MS e MS/2 na germinação de sementes de *Plinia peruviana* e *Plinia cauliflora* var. paulista, o efeito da concentração de *Plant Preservative Mixture*TM (PPMTM) (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 ml.L⁻¹) na inibição de crescimento de microrganismos, o efeito da ausência de nutrientes e presença de carvão ativado e polivinilpirrolidona-40 (1 ou 3 g.L⁻¹) no meio de germinação de sementes de *Plinia cauliflora* var. sabará. Para a etapa de indução de brotos, foram testadas as citocininas 6-benzilaminopurina (0; 2,22; 4,44; 6,66; 8,88 µM) para as três jabuticabeiras e cinetina (0; 2,33; 4,65; 6,97; 9,30 µM na presença ou ausência de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado (CA)) para *Plinia cauliflora* var. sabará. Segmentos nodais cultivados *in vitro* e folhas do campo foram usados para o isolamento de bactérias endofíticas. Os isolados foram testados com relação a produção de compostos indólicos, na promoção da germinação de sementes de jabuticabeira *in vitro* e acerca da sensibilidade a antibióticos. Nos meios WPM e MS/2, as sementes apresentaram taxa de germinação de 40%, significativamente maior que no meio MS. A adição de 3 g.L⁻¹ de CA causou aumento da germinação (95%), redução da oxidação do meio (20%), aumento do tamanho da parte aérea (6,18 cm) e do índice de velocidade de germinação (IVG) em relação ao meio sem adição de CA. O PPMTM foi eficiente no controle de microrganismos endofíticos na concentração de 1,0 ml.L⁻¹. A adição de BAP em concentração de 4,4 µM resultou em maior multiplicação e tamanho médio de brotos para as espécies *Plinia peruviana* (taxa de 1,88 em dois meses e brotos de 6,50 mm) e *Plinia cauliflora* var. paulista (taxa de 2,43 em dois meses e brotos de 10,53 mm). As citocininas testadas não afetaram a taxa de multiplicação da espécie *Plinia cauliflora* var. sabará; na presença de CA e todas as variáveis apresentaram menores médias em comparação com a sua ausência. Foram isoladas 65 bactérias, 11 a partir de segmentos nodais e 54 de folhas. Todas as bactérias avaliadas produziram compostos indólicos na ausência do triptofano; entre as maiores produtoras foram identificados os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S. A inoculação de bactérias isoladas em sementes de jabuticaba causou aumento na taxa de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG): 97% e IVG 1,35 (*Stenotrophomonas* spp.); 85,34% e IVG 1,21 (*Bacillus* spp.); contra 74,67% e IVG 0,86 do controle. A estirpe Ab-V6 de *Azospirillum brasiliense* usada como referência aumentou o tamanho médio das raízes. Amoxicilina, cloranfenicol, estreptomicina e levofloxacina inibiram o crescimento de isolados obtidos das culturas *in vitro*. Em conclusão, foi desenvolvido um protocolo eficiente de germinação *in vitro*, porém, a multiplicação das jabuticabeiras é baixa e ocorre de forma lenta. Além disso, as bactérias endofíticas revelaram capacidade de promoção do crescimento das plântulas de *Plinia peruviana* obtidas de sementes germinadas *in vitro*.

Palavras-chave: bactérias endofíticas; cultura de tecidos; jabuticaba de cabinho; jabuticaba paulista; jabuticaba sabará; *Plant preservative Mixture*TM; rRNA 16S.

ABSTRACT

This work aimed at initiating a micropropagation protocol by axillary bud multiplication for *Plinia peruviana*, *Plinia cauliflora* var. paulista and sabará, starting with the *in vitro* seed germination protocol, and investigating the endophytic community associated with *in vitro* cultured tissues and a field plant of *Plinia peruviana*. During the *in vitro* germination, the effect of the following factors was evaluated: culture media composition (WPM, WPM/2, MS and MS/2) with seeds of *Plinia peruviana* and *Plinia cauliflora* var. paulista, Plant Preservative Mixture™ (PPM™) (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0; 16.0 ml.L⁻¹) as biocide and the absence of nutrients in the culture medium and presence of activated charcoal and polyvinylpyrrolidone-40 (1 or 3 g.L⁻¹) with seeds of *Plinia cauliflora* var. sabará. For the bud induction step the effect of 6-benzylaminopurine (0, 2.22; 4.44; 6.66; 8.88 μM) was tested for the three species and kinetin (0, 2.33; 4, 65, 6.97, 9.30 μM, in the presence or absence of 1 g.L⁻¹ activated charcoal (AC)) for *Plinia cauliflora* var. sabará. *In vitro* cultivated nodal segments and leaves from field trees were used for the isolation of endophytic bacteria. The isolates were tested for the production of indole compounds, for the promotion of the *in vitro* germination of jabuticaba seeds and for its antibiotic sensitivity. In WPM and M/2 culture media, the germination rate was 40%, significantly higher than in MS medium, and the other variables did not vary significantly. The addition of AC at 3 g.L⁻¹ caused increased germination rate (95%), reduced oxidation of the medium (20%), increased shoot size (6.18 cm) and germination speed when compared to the medium without AC. PPM™ was efficient in controlling endophytic microorganisms at a concentration of 1.0 ml.L⁻¹. The addition of BAP at 4.4 μM resulted in increased multiplication rates and shoot size for *Plinia peruviana* (rate of 1.88 in two months and size of 6.50 mm) and *Plinia cauliflora* var. paulista (rate of 2.43 in two months and size of 10.53 mm). The cytokinins tested did not affect the multiplication rate of *Plinia cauliflora* var. sabará. When AC was added to the culture medium, all variables presented lower means than in its absence. Sixty-five bacteria were isolated, 11 from nodal segments and 54 from leaves. All bacteria evaluated produced indolic compounds in the absence of tryptophan. Among the major producers that were identified by sequencing the 16S rRNA gene are the genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*. Inoculation of isolated bacteria in jabuticaba seeds caused an increase in germination rate and germination speed (GS): 97% and IVG 1.35 (*Stenotrophomonas* spp.); 85.34% and IVG 1.21 (*Bacillus* spp.); against 74.67% and IVG 0.86 of the control. The reference Ab-V6 strain of *Azospirillum brasilense* promoted the root growth. Amoxicillin, chloramphenicol, streptomycin and levofloxacin inhibited the growth of isolates obtained from *in vitro* cultures. In conclusion, an efficient protocol was developed for *in vitro* germination but the *in vitro* multiplication of jabuticaba trees is low and occurs slowly. Furthermore, the endophytic bacteria revealed their capacity to promote growth of *Plinia peruviana* seedlings obtained from *in vitro* germinated seeds.

Keywords: endophytic bacteria; jabuticaba de cabinho; jabuticaba paulista; jabuticaba sabará; Plant preservative Mixture™; tissue culture; 16S rRNA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 A FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS. E O GÊNERO <i>PLINIA</i> L.	18
2.1.1 A família Myrtaceae.....	18
2.1.2 O gênero <i>Plinia</i>	19
2.1.3 <i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel.....	19
2.1.4 <i>Plinia peruviana</i> (Poir.) Govaerts.....	20
2.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	22
2.3 A MICROPROPAGAÇÃO	24
2.4 A MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES	25
2.5 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	27
REFERÊNCIAS	29
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL	42
2.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	42
2.2.1 Desinfestação e condições de cultura	42
2.2.2 Meios de cultura na germinação de sementes <i>Plinia cauliflora</i> var. paulista e <i>Plinia peruviana</i>	43
2.2.3 Carvão ativado, polivinilpirrolidona-40 e meio de cultura na germinação de sementes de <i>Plinia cauliflora</i> var. sabará	43
2.2.4 PPM™ na germinação de sementes de <i>Plinia cauliflora</i> var. sabará.....	44
2.3 MULTIPLICAÇÃO	44
2.3.1 Condições de cultura.....	44
2.3.2 Multiplicação de <i>Plinia cauliflora</i> var. paulista e <i>Plinia peruviana</i>	44
2.3.3 Multiplicação de <i>Plinia cauliflora</i> var. sabará	45
2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	46
3.1.1 Efeito dos meios de cultura na germinação de sementes de <i>Plinia cauliflora</i> var. paulista e <i>Plinia peruviana</i>	46

3.1.2 Efeito do carvão ativado, polivinilpirrolidona-40 e meio de cultura na germinação de sementes de <i>Plinia cauliflora</i> var. <i>sabará</i>	47
3.1.3 Efeito do PPM™ na germinação de sementes de <i>Plinia cauliflora</i> var. <i>sabará</i>	48
3.2 MULTIPLICAÇÃO	51
3.2.1 Multiplicação de <i>Plinia cauliflora</i> var. <i>paulista</i> e <i>Plinia peruviana</i>	51
3.2.2 Multiplicação de <i>Plinia cauliflora</i> var. <i>sabará</i>	52
4 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	68
2.2 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	68
2.3 CARACTERIZAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	69
2.4 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS	69
2.5 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE JABUTICABEIRA INOCULADAS COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE <i>PLINIA PERUVIANA</i>	70
2.6 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RRNA.....	71
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	72
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	73
3.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS	74
3.4 GERMINAÇÃO DE SEMENTES <i>IN VITRO</i> INOCULADAS COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE <i>PLINIA PERUVIANA</i>	75
3.5 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	77
4 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80
CONCLUSÕES GERAIS	86
ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA	88
ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA	89

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil detém uma das maiores diversidades genéticas de espécies frutíferas do mundo, a qual, em sua quase totalidade ainda é pouco conhecida (RASEIRA et al., 2004). A exploração de frutas nativas é feita em geral, de forma extrativista, com pouca transposição para o mercado nacional e internacional (VIEIRA et al., 2018). A subutilização deste valioso recurso nutricional e econômico pode estar relacionada a não domesticação da maioria das frutíferas nativas (CLEMENT, 2001) e a uma maior valorização ao que é exótico, principalmente devido a sobreposição da cultura europeia à cultura indígena (CARVALHO, 2012). Por outro lado, embora os mercados e feiras ainda sejam dominados por frutas exóticas, o interesse da sociedade atual por frutas autóctones está em ascensão, motivado pela busca crescente por alimentos alternativos e saudáveis (VIEIRA et al., 2010). Nesse contexto, aprofundar os conhecimentos e desenvolver tecnologias para melhorar a propagação de frutíferas nativas é de grande importância. Uma vez que, para o estabelecimento de pomares comerciais é necessário o uso de mudas geneticamente homogêneas e de alta qualidade é necessário.

As jabuticabeiras (*Plinia* spp., Myrtaceae) são árvores frutíferas nativas do Brasil e produzem a jabuticaba, um dos frutos mais apreciados do país (MATTOS, 1983). A jabuticaba está presente no documento “Plantas para o futuro” lançado em 2011 pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), onde são identificadas plantas nativas com potencial econômico pouco explorado (CORADIN e SIMINSKI, 2011). Ainda de acordo com o MMA, a jabuticaba tem potencial para se tornar a fruta símbolo da biodiversidade alimentar do país, dado seus atributos organolépticos, caso haja investimentos em produção em larga escala. Entretanto, atualmente a exploração da jabuticaba é feita de forma extrativista (CITADIN et al., 2010). A propagação da espécie enfrenta problemas e é um dos fatores que dificultam o estabelecimento de pomares comerciais. Suas sementes são recalcitrantes e não podem ser armazenadas por mais de 30 dias (DANNER et al., 2011). Além disso, métodos clássicos de propagação vegetativa ainda não foram estabelecidos de forma eficiente (SASSO et al., 2010).

A micropropagação por multiplicação de gemas axilares ainda não foi relatada para nenhuma espécie de jabuticabeira. Essa técnica possibilita a propagação massal de mudas homogêneas e de alta qualidade fitossanitária (HARTMANN et al., 2014).

A micropropagação já foi estabelecida com sucesso para outras espécies de Myrtaceae, como: goiabeira, eucalipto, feijoa, pitangueira, uvaieira, gabirobeira, entre outras (OLTRAMARI et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2008; SOUZA et al., 2008; DUTRA et al., 2009; RAI et al., 2009). Segundo George et al. (2008), o uso de explantes jovens e saudáveis interfere diretamente no sucesso da técnica. A germinação de sementes *in vitro* é um meio de obter explantes jovens com menor quantidade de contaminantes, principalmente epifíticos. Entretanto, germinar sementes *in vitro* não garante a ausência de bactérias endofíticas nos explantes.

Atualmente sabe-se que é quase impossível manter culturas de tecidos *in vitro* de forma axênicas. Mesmo que essas não manifestem contaminação por longo período, geralmente endófitos estão presentes de forma latente (ESPOSITO-POLESI, 2011). Bactérias endofíticas são estreitamente ligadas aos hospedeiros, em muitos casos devido a um processo de coevolução; vivem no interior dos tecidos vegetais e não causam sintomas visíveis *in situ* (HALLMANN et al., 1997). Apesar da contaminação microbiana ser considerada um dos principais problemas na cultura de tecidos (CASSELLS, 1991), estudos já revelaram benefícios da presença desses microrganismos para as culturas *in vitro* (PILLAY et al., 1997; NOWAK, 1998; THOMAS et al., 2004; PANICKER et al., 2007). Algumas bactérias endofíticas são classificadas como promotoras do crescimento vegetal (em inglês – *plant growth promoting bacteria* – PGPB), em parte, devido a sua capacidade de síntese de fitormônios que são disponibilizados para o hospedeiro (SANTOYO et al., 2016). Estudos com o objetivo de investigar a composição endofítica das jabuticabeiras não foram encontrados. Tal conhecimento poderia dar aporte para as técnicas de micropropagação, tanto no controle como no uso para promoção do crescimento vegetal.

O primeiro capítulo dessa dissertação é o resultado da pesquisa realizada com o objetivo de micropropagar as espécies *Plinia peruviana*, *Plinia cauliflora* var. paulista e var. sabará por multiplicação de gemas axilares. Para isso, iniciando-se com o desenvolvimento um protocolo eficiente de germinação de sementes *in vitro*. O segundo capítulo traz os resultados do estudo das bactérias endofíticas associadas a *Plinia peruviana*, e teve como principal objetivo avaliar o efeito das bactérias na promoção da germinação e do crescimento de plântulas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A FAMÍLIA MYRTACEAE JUSS. E O GÊNERO *Plinia* L.

2.1.1 A família Myrtaceae

A família Myrtaceae é composta atualmente por cerca de 6000 espécies, classificadas em 145 gêneros (GOVAERTS et al., 2015). Sua distribuição é de ampla ocorrência no mundo, com predomínio em regiões tropicais e subtropicais do hemisfério sul (BARROSO et al., 1991; MARCHIORI e SOBRAL, 1997).

Myrtaceae é considerada uma das mais importantes famílias botânicas do Brasil (LANDRUM e KAWASAKI, 1997; OLIVEIRA-FILHO e FONTES, 2000), onde ela é representada por cerca de 1000 espécies (\cong 800 endêmicas) distribuídas em 23 gêneros (SOBRAL et al., 2015), todas pertencentes à tribo Myrteae (WILSON et al., 2005). A Mata Atlântica é o bioma com maior representatividade da família, com aproximadamente 700 espécies (SOBRAL et al., 2015), sendo uma das famílias lenhosas dominantes (REITZ et al., 1978; PEIXOTO e GENTRY, 1990).

Em relação à taxonomia do grupo, segundo McVaugh (1968), a família é considerada complexa devido ao uso de caracteres diagnósticos crípticos, às descrições taxonômicas genéricas e à escassez de estudos taxonômicos.

Os representantes da família Myrtaceae são todos lenhosos, com hábito arbóreo ou arbustivo (SOBRAL et al., 2015). A madeira produzida pelas mirtáceas nativas em geral não é de valor comercial e geralmente destina-se à produção de lenha (MARCHIORI e SOBRAL 1997). Entretanto, como exceção destaca-se o gênero *Eucalyptus*, que possui madeira muito valorizada para produção de celulose, papel e na construção civil (HIGA et al., 2000). Várias espécies de Myrtaceae são utilizadas no paisagismo, principalmente devido a beleza ornamental de suas flores (LORENZI, 2005). Todas produzem frutos carnosos, muitos deles comestíveis (LANDRUM e KAWASAKI, 1997). Entretanto, no Brasil a exploração econômica das frutíferas da família é relativamente pequena, restringindo-se a poucas espécies, como: goiaba, araçá, pitanga e jabuticaba (GRESSLER et al., 2006; LORENZI, 2009).

2.1.2 O gênero *Plinia*

Plinia L. é um gênero da família Myrtaceae no qual estão classificadas as populares frutíferas brasileiras conhecidas como jabuticabeiras (Figura 1). Anteriormente as jabuticabeiras eram classificadas como *Myrciaria*, quando Sobral (1985) propôs a alteração para o gênero *Plinia*. Apesar da proposta ser amplamente aceita, alguns estudos recentes ainda abordam essas frutíferas como *Myrciaria* (LIMA et al., 2008; SANTOS et al., 2010; LEITE et al., 2011). O gênero *Plinia* ocorre desde a América do Sul até a América central e o Caribe (LANDRUM e KAWASAKI, 1997). No Brasil são confirmadas 33 espécies do gênero, das quais 28 são endêmicas, com distribuição nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e estão presentes nos Biomas da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal e principalmente na Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2015).

As jabuticabeiras das espécies *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel, conhecida popularmente como “jabuticaba paulista” e *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, conhecida como “jabuticaba de cabinho” produzem jabuticabas apreciadas para o consumo *in natura* e fabricação de geleias, sucos e licores (DANNER et al., 2006). A espécie *Plinia jaboticaba* (Vell.) Kausel, que recebe o nome popular de “jabuticaba sabará” hoje é considerada sinônimo heterotípico de *P. cauliflora* (SOBRAL et al., 2015). Entretanto, Danner (2009) mostra que existem diferenças significativas em vários caracteres morfológicos (tamanho da folha, estruturas da flor e características físicas do fruto) entre *P. cauliflora* e o sinônimo *P. jaboticaba*. Estudos genéticos seriam de extrema contribuição para uma melhor definição das espécies de jabuticabeiras e seus sinônimos, entretanto, são praticamente ausentes na literatura (SILVEIRA, et al., 2006).

2.1.3 *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel

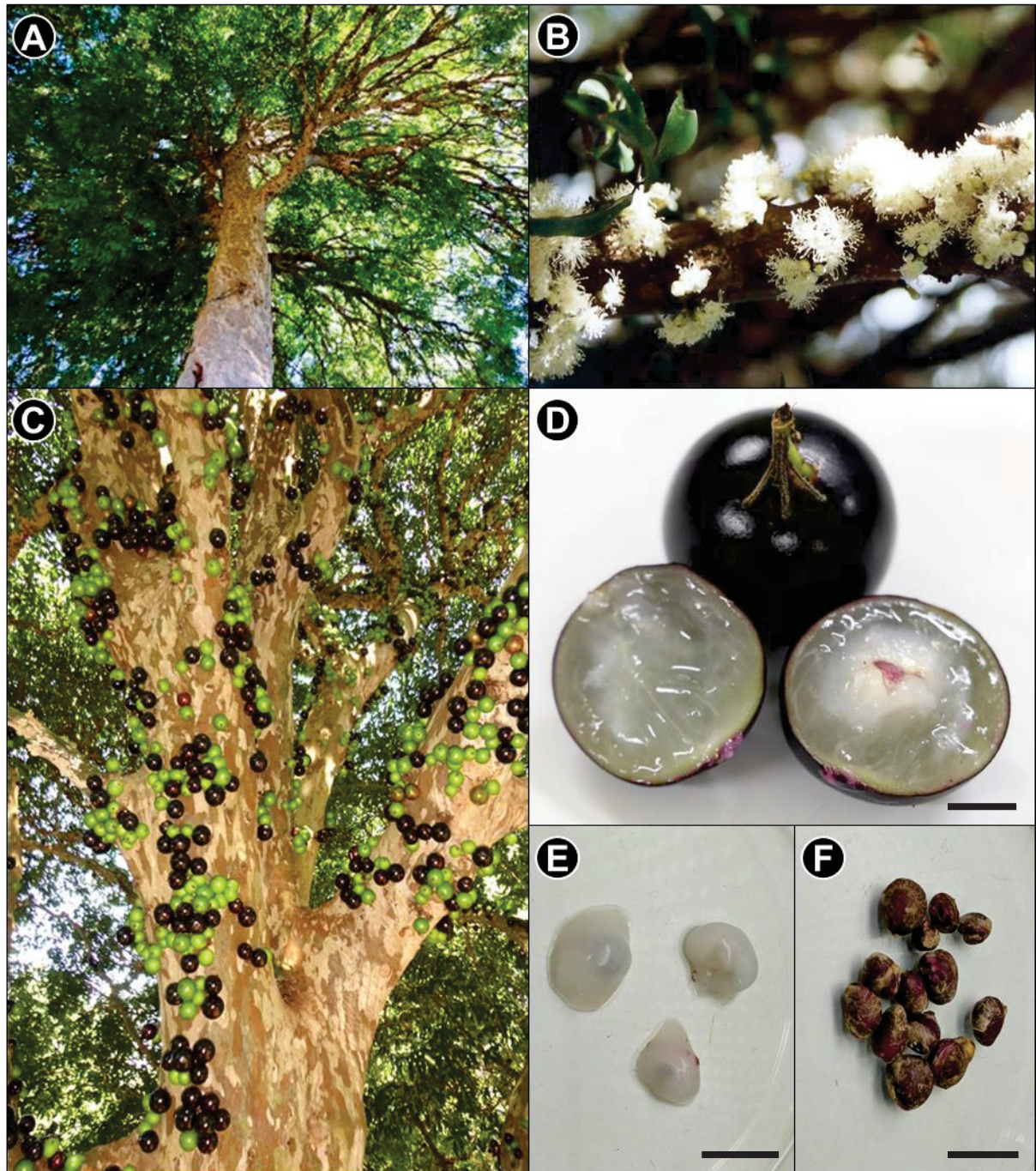
A espécie *P. cauliflora* é endêmica do Brasil, de ocorrência nas regiões Sul (Paraná), Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo) e Nordeste (Bahia e Pernambuco) (Figura 2), no Bioma Mata Atlântica e Floresta Ombrófila. Tem hábito arbóreo, caule com textura da casca membranácea e tronco liso, inflorescência caulinar tipo glomérulo, flor em cálice, bractéola livre decídua no fruto, cálice fundido e superfície pilosa, fruto globoso glabra de 2 a 5 cm de diâmetro;

(SOBRAL et al., 2015). Possui pedúnculo com cerca de apenas 1 mm, sendo a principal característica distintiva entre os frutos dessa espécie e de *P. peruviana*. Floresce principalmente na primavera, mas pode produzir até duas vezes ao ano e não possui madeira de interesse comercial, sendo utilizada apenas para lenha e carvão (LORENZI, 2009). A variedade “sabará”, anteriormente descrita como *P. jaboticaba*, é a mais cultivada no Brasil, com pomares comerciais principalmente em São Paulo e Minas Gerais (MATTOS, 1983).

2.1.4 *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts

A espécie *P. peruviana* tem como sinônimos heterotípicos os nomes *Myrciaria trunciflora* e *Plinia trunciflora* (GOVAERTS et al., 2015). É conhecida popularmente como “jaboticaba de cabinho”, devido ao pedúnculo do fruto ser visivelmente maior que em outras jaboticabas (SOARES-SILVA, 2000). É nativa do Brasil e ocorre nas regiões Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) e Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais) (Figura 1), no Bioma Mata Atlântica, Floresta Ombrófila e Floresta Ombrófila Mista (SOBRAL et al., 2015). Tem hábito arbóreo, com altura de 6 a 14 m, tronco reto de casca fina e lisa; sua madeira pode ser utilizada para a confecção de tábuas, lenha ou carvão. Floresce principalmente entre julho e setembro, produzindo grande quantidade de frutos uma vez ao ano (LORENZI, 2009).

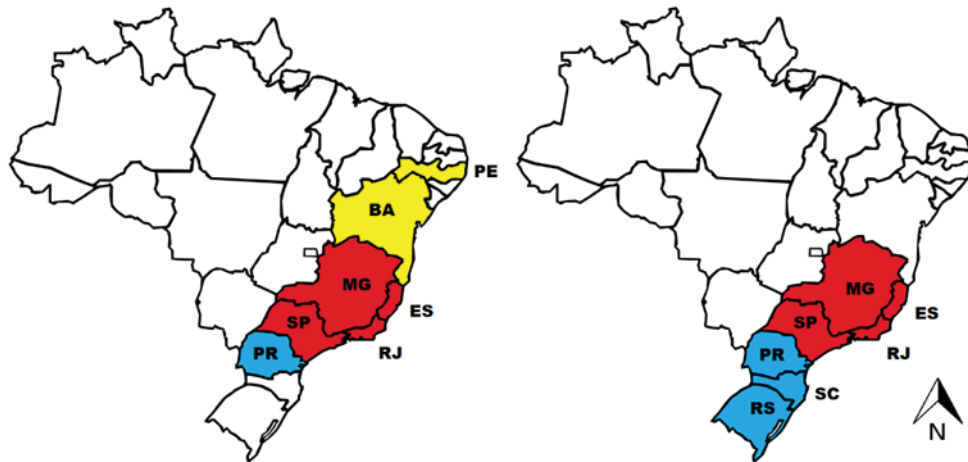
FIGURA 1 – APARÊNCIA DA ÁRVORE, FLORAÇÃO, FRUTIFICAÇÃO, FRUTO E SEMENTES DE *Plinia* spp.



FONTE: rodapé¹. NOTA: A: aspecto do tronco e galhos de uma jabuticabeira; B: flores sobre galhos e tronco; C: jabuticabas maduras (roxo) e imaturas (verde); D: aspecto do pedúnculo, casca e polpa de uma jabuticaba; E: sementes de jabuticaba com a mucilagem aderida ao tegumento; F: sementes de jabuticaba após retirada da mucilagem. Barra: 1 cm.

¹A-C: Flora digital. Laboratório de Fitoecologia e Fitogeografia, Programa de Pós-Graduação em Botânica. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php>> acessado: agosto 2019. Fotografias: A: José Fernando Richit; B: João Augusto Bagatini; C: Daniel Grasel. D: CEAGESP. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/guia-ceagesp/jabuticaba/>> acessado: agosto 2019. E-F: o autor (2019).

FIGURA 2 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS JABUTICABEIRAS *Plinia cauliflora* (ESQUERDA) E *Plinia peruviana* (DIREITA) NO BRASIL



FONTE: o autor (2019). NOTA: Azul: estados da região Sul. Vermelho: estados da região Sudeste. Amarelo: estados da região Nordeste.

2.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

A germinação de sementes *in vitro* é utilizada na cultura de tecidos para a obtenção de plântulas que podem fornecer explantes jovens e assépticos para técnicas de micropropagação (OLIVEIRA et al., 2013). Folhas, segmentos nodais, hipocótilos e raízes são tecidos comumente utilizados como explantes por uma ou mais técnicas de micropropagação, na embriogênese somática, multiplicação de gemas axilares ou na indução de brotos adventícios (DEBERGH e READ, 1991; ANIS, 2016). A juvenildade do explante é um fator decisivo para o sucesso destas técnicas (READ, 1988), visto que tecidos jovens apresentam crescimento rápido devido à maior atividade meristemática e metabólica, alto nível endógeno de hormônios e maior plasticidade *in vitro* (SKOOG & MILLER, 1957). Além disso, explantes jovens podem apresentar menor oxidação por compostos fenólicos (TEIXEIRA, 2005).

As sementes das espécies de jaboticabeira apresentam mucilagem aderida à semente, dificultando a limpeza do tegumento (DANNER et al., 2007). Assim, a retirada da mucilagem pode ser realizada de forma manual e sem injúrias ao tegumento (PICOLOTTO et al., 2007). Porém, esse processo é lento, dificultando experimentos que necessitam de uma grande quantidade de sementes para a introdução *in vitro*. O processo de retirada da mucilagem também pode ser realizado com a adição de óxido de cálcio (cal virgem) e fricção em peneira de malha fina (WAGNER JÚNIOR et al., 2011). Aparecida Dias et al. (2011) utilizaram a fricção com

areia e solução de hipoclorito de sódio 2% para a extração da mucilagem de *Myrciaria cauliflora*. Carmona et al. (1994) propõem um método de extração química da mucilagem de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium*), por fermentação da mucilagem por meio da adição de solução de hidróxido de amônio 25% por 48 h. Certos métodos de extração da mucilagem ferem o tegumento da semente e, em consequência, podem aumentar a oxidação fenólica *in vitro* (MONACO et al., 1977).

Um dos principais requisitos para o sucesso de protocolos de micropropagação é a assepsia do material vegetal (GEORGE et al., 2008; ANIS e AHMAD 2016). O uso de explantes coletados de plantas de ambientes não controlados, geralmente resultam em grande porcentagem de contaminação mesmo após a desinfestação do material. Outra possibilidade é a utilização de plantas matrizes mantidas em condições ambientais mais controladas, como em casas de vegetação. Nesse caso, é possível realizar a pulverização de agentes químicos para o controle de fungos e bactérias (ARAUJO et al., 2016; ERIG, 2005). Entretanto, na germinação *in vitro* é possível desinfestar as sementes antes da inoculação no meio de cultura, eliminando praticamente todos os microrganismos epifíticos. Souza et al. (2011) obtiveram apenas 2% de contaminação *in vitro* de sementes de guabijuzeiro (*Myrcianthes pungens*) após desinfestação com álcool etílico (70%, 1 minuto) e hipoclorito de sódio (6%, 20 minutos). No estudo de Silveira (2018), a contaminação foi de apenas 6,7% após desinfestação de sementes de jabuticaba (*P. peruviana*) com álcool etílico (70%, 1 minuto) e hipoclorito de sódio (5%, 10 minutos). Grande parte dos protocolos de desinfestação de sementes e explantes utilizam soluções de álcool etílico e hipoclorito de sódio. Além disso, para o controle dos microrganismos endofíticos é amplamente utilizado o *Plant Preservative Mixture*TM (PPMTM), um biocida de amplo espectro (GURI e PATEL, 1998).

Outra vantagem da germinação de sementes *in vitro* é não depender de condições climáticas das estações do ano, uma vez que temperatura e luminosidade são controladas em salas de crescimento para fornecer condições ótimas de germinação e crescimento das plântulas. Geralmente, a temperatura das salas de crescimento é mantida em 25°C com variações de ± 1 a 2°C. Esta faixa de temperatura potencializa a germinação e crescimento de várias sementes recalcitrantes, que muitas vezes não toleram baixas temperaturas (NEVES, 1994). As jabuticabeiras, assim como várias espécies da família Myrtaceae, apresentam sementes recalcitrantes (SASSO et al., 2010). A utilização do fotoperíodo de 16h favorece a

germinação de sementes fotoblásticas positivas (DOS SANTOS, 2004). Silveira (2018) não verificou diferença significativa entre os resultados da germinação de sementes de jabuticabeira mantidas em fotoperíodo de 16h ou totalmente no escuro.

Os meios de cultura *Woody Plant Medium* (WPM) de Lloyd e McCown (1980) e de Murashige e Skoog (1962) (MS) são amplamente utilizados na germinação de sementes *in vitro* e em outras etapas da micropropagação (THORPE, 1994). Esses meios de cultura fornecem macronutrientes, micronutrientes e vitaminas essenciais para o desenvolvimento da plântula (GEORGE et al., 2008). Além dos componentes padrões dessas formulações de meio de cultura, aditivos podem ser empregados para situações específicas. A oxidação por compostos fenólicos pode ocorrer em sementes e explantes quando introduzidos no meio de cultura. Tais compostos são produzidos em resposta a injúrias mecânicas, altas temperaturas, em resposta ao contato com compostos utilizados na desinfestação, entre outras razões (MONACO et al., 1997). Antioxidantes e carvão ativado são empregados para reduzir a oxidação (TEIXEIRA, 2005). Reguladores vegetais também podem maximizar a taxa de germinação das sementes. Entretanto, encarecem o protocolo e nem sempre apresentam um bom custo benefício devido a seu alto custo.

2.3 A MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação agrupa um conjunto de técnicas de propagação assexuada por meio da cultura de tecidos *in vitro*, que tem como principal objetivo a produção massal de clones (HARTMANN e KESTER, 2014). As técnicas de micropropagação são realizadas por organogênese ou embriogênese somática (GEORGE et al., 2008). As de organogênese baseiam-se na produção de estruturas unipolares (geralmente brotos). Por outro lado, a embriogênese somática tem como resultado a produção de embriões a partir de células somáticas (SMITH, 2013; DEBERGH e READ, 1991). Debergh e Maene (1981) propuseram a divisão das técnicas de micropropagação por organogênese em cinco etapas: (I) escolha da planta mãe; (II) estabelecimento de culturas assépticas; (III) multiplicação; (IV) enraizamento dos brotos; (V) transplântio e aclimatização.

A etapa de escolha da planta matriz é considerada de grande importância para o sucesso das etapas seguintes, pois, o estado fisiológico e fitossanitário da planta doadora interfere diretamente na resposta dos explantes (GEORGE et al.,

2008). A micropropagação utiliza como fonte inicial pequenos fragmentos de tecidos da planta doadora, chamados de explantes (READ, 1988). Os explantes são mantidos em meio de cultura nutritivo asséptico, geralmente adicionado de regulares vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas, entre outros) sob condições ambientais de temperatura e luminosidade controladas (GEORGE et al., 2008). As respostas morfogênicas dos explantes, como a formação de calo, brotos, raízes, ou a combinação destas, são dependentes da natureza dos regulares vegetais utilizados e também da concentração (GASPAR et al., 1996).

A segunda etapa da micropropagação é caracterizada pela produção massal de brotos em subcultivos consecutivos (THORPE, 1990). O enraizamento dos brotos geralmente é realizado *in vitro* na presença de auxinas (GASPAR et al., 1996; SMITH, 2013). A aclimatização é a última etapa dos protocolos de micropropagação e se faz necessária para a habituação das plântulas geradas *in vitro* às condições variáveis do ambiente externo (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999).

Técnicas de micropropagação são empregadas com bons resultados para plantas lenhosas recalcitrantes aos métodos tradicionais de propagação assexuada (estaquia e enxertia), como por exemplo, as jabuticabeiras (THORPE, 1990; GEORGE et al., 2008; DANNER, et al., 2006). As técnicas de micropropagação apresentam várias vantagens em relação a esses métodos tradicionais para espécies frutíferas: possibilitam a clonagem de genótipos selecionados, homogeneizando os pomares (OLIVEIRA et al., 2013); são indicadas para a produção de mudas livres de vírus e doenças, por meio da cultura de meristemas (GROUT, 1990; WENDLING et al., 2006); para espécies de difícil enraizamento na estaquia (TEIXEIRA, 2001); podem ser aliadas aos métodos clássicos de melhoramento; possibilitam a produção massal de mudas em um pequeno espaço físico, independente das condições climáticas (HARTMANN e KESTER, 2014), entre outras vantagens. Para as espécies florestais nativas, a micropropagação por multiplicação de gemas axilares (organogênese) é o método mais utilizado de propagação *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2013).

2.4 A MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES

A micropropagação por multiplicação de gemas axilares é a técnica de propagação vegetal massal mais utilizada comercialmente (GEORGE et al., 2008). Baseia-se na quebra da dominância apical pela aplicação exógena de reguladores

vegetais, principalmente citocininas, as quais induzem as gemas laterais a se alongarem em brotos (GASPAR et al., 1996). Existe também a possibilidade de desenvolvimento de brotos adventícios. A técnica é considerada de fácil aplicação e apresenta resultados satisfatórios na propagação massal de clones, principalmente de espécies recalcitrantes, em relação aos métodos tradicionais de propagação vegetativa (ANIS e AHMAD 2016; GEORGE et al., 2008). Além disso, brotos gerados a partir de gemas axilares apresentam estabilidade clonal, sendo este o método de micropropagação com menor possibilidade de apresentar variação somaclonal (HARTMANN e KESTER, 2014).

Os explantes utilizados para a proliferação de gemas axilares podem ser segmentos nodais isolados com uma ou mais gemas laterais, ou segmentos caulinares com vários nós e gemas (GEORGE et al., 2008). A obtenção desses explantes é dada pela coleta em plantas maduras ou por plântulas recém germinadas (OLIVEIRA et al., 2013). Quando se opta por realizar a coleta em plantas maduras, geralmente uma poda drástica prévia é necessária para a indução de brotações jovens (SCHWENGBER et al., 2000; PORTES FERRIANI et al., 2006). Entretanto, como já mencionado, explantes oriundos de plantas *ex vitro* apresentam maior taxa de contaminação. O tamanho usual dos segmentos nodais utilizados na multiplicação é de 10 a 20 mm de comprimento. Estes podem ser inoculados no meio na posição vertical ou horizontal (GEORGE et al., 2008).

Para induzir o crescimento e multiplicação dos brotos axilares, quebrando a dominância apical, citocininas são aplicadas ao meio de cultura (GEORGE et al., 2008). Por sua vez, podem ser utilizadas de forma isolada ou combinadas, e ainda, quando necessário, são aliadas a pequenas concentrações de auxinas (HARTMANN e KESTER, 2014). As citocininas mais utilizadas são: 6-benzilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenina (2iP), zeatina (ZEA), cinetina (CIN) e thidiazuron (TDZ). Entre elas, a BAP é a mais a mais utilizada, devido ao seu custo relativamente baixo e por apresentar bons resultados na fase de multiplicação (HARTMANN e KESTER, 2014).

Assim como na germinação *in vitro*, os meios MS e WPM são os mais utilizados na multiplicação de gemas axilares de plantas lenhosas. Nesta fase, é indispensável a adição de componentes que sejam fonte de carbono para o desenvolvimento dos brotos (THORPE, 1994). Nesse sentido, a sacarose é um dos principais açúcares utilizados, geralmente na concentração de 30 g.L⁻¹. Isso ocorre porque plantas mantidas *in vitro* não são capazes de sintetizar carbono pela

fotossíntese, assim, a etapa de aclimatização é necessária para as plantas voltarem para um regime autotrófico (GEORGE et al., 2008). Portanto, devido ao consumo pelos explantes, subcultivos regulares são necessários para a renovação do meio de cultura (THORPE et al., 1990). Além disso, os subcultivos são realizados para a multiplicação das culturas *in vitro*. Nesta etapa, brotos alongados podem ser enraizados ou excisados em vários segmentos nodais que, por sua vez, renovam a etapa de multiplicação (DEBERGH e READ, 1991).

Após a introdução dos segmentos nodais *in vitro*, manter as culturas no escuro por até duas semanas pode ser útil para evitar a oxidação dos explantes (MARKS e SIMPSON, 1990). Em seguida, pode-se adotar o fotoperíodo de 16 h, sob temperatura de 25 °C, que são condições ambientais controladas amplamente empregadas na cultura de tecidos (ANDRADE, 2002).

A oxidação por compostos fenólicos, contaminação por microrganismos endógenos, hiperhidricidade e a habituação aos reguladores vegetais são problemas que podem surgir durante a multiplicação (SANTOS, 2001). Compostos fenólicos podem ser tóxicos para os explantes; assim, é desejável que as culturas não apresentem oxidação. O uso de antioxidantes pode sanar ou minimizar a oxidação (MONACO et al., 1997). Polivinilpirrolidona (PVP), carvão ativado, ácido ascórbico, ácido cítrico e cisteína são compostos empregados para este fim. Em relação à contaminação endofítica, o PPM™ apresenta resultados satisfatórios no controle de microrganismos (SILVEIRA, 2018; GURI & PATEL, 1998).

2.5 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Bactérias endofíticas são aquelas encontradas no interior de tecidos vegetais, não notáveis visualmente por não causarem alterações morfológicas ao hospedeiro (AZEVEDO, 1998). São definidas como endofíticas, por apresentarem parte do ciclo de vida no interior de vegetais (PEIXOTO NETO et al., 2002). Esses microrganismos geralmente não causam danos ao hospedeiro, pelo contrário, podem estar envolvidos de forma direta ou indireta em vários processos do desenvolvimento do vegetal: melhoram a nutrição do hospedeiro (RODRIGUES SALA et al., 2008); podem produzir hormônios, exercendo função de promotor do crescimento vegetal (MELLONI et al., 2004); aumentam a imunidade do hospedeiro a infecções por patógenos; podem estar

envolvidos na fixação de nitrogênio, além de auxiliar na obtenção de outros nutrientes (KUSS et al., 2007; MARQUES JÚNIOR et al., 2008).

Apesar dos vários benefícios trazidos por bactérias endofíticas, em técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, estas podem causar danos aos explantes e geralmente causam a perda do material contaminado (CASSELLS, 1991). A desinfestação de explantes que são introduzidos *in vitro* é praticamente indispensável, a não ser que estes já sejam cultivados em meio asséptico (PICOLOTTO et al., 2007). Entretanto, apesar dos protocolos usuais de desinfestação serem eficientes para eliminação dos microrganismos epifíticos, eles geralmente não são capazes de eliminar a comunidade endofítica. Isso ocorre, pois, as soluções desinfetantes podem ser tóxicas aos explantes, causando danos ou até mesmo a necrose do tecido quando submetido a tempos longos de desinfestação (PEREIRA et al., 2003). Desta forma, as culturas vegetais não podem ser consideradas axênicas, pois mesmo em tecidos saudáveis e assintomáticos mantidos *in vitro* podem ocorrer bactérias endofíticas (ABREU-TARAZI et al., 2010).

As técnicas de cultura de tecidos podem ser uma ferramenta importante para avaliar estes efeitos (NOWAK, 1998; ABREU-TARAZI, 2010), uma vez que as influências ambientais são controladas e a nutrição é maximizada pelo meio de cultura rico (LEONE, 2013). Plantas micropropagadas podem se beneficiar da interação com bactérias endofíticas, pois segundo Ryan (2008), principalmente devido a solubilização do fosfato, produção de ácido indolacético, no controle osmótico, absorção de nutrientes e outras vantagens.

REFERÊNCIAS

- ABREU-TARAZI, M. F.; NAVARRETE, A. A.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, C. V.; TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.
- ANDRADE, S.R.M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Cerrado. Documentos 58. Planaltina, DF**, pp. 1-16. 2002.
- ANIS, M.; AHMAD, N. **Plant tissue culture: Propagation, conservation and crop improvement**. Springer. p. 1–621, 2016.
- APARECIDA DIAS, M.; LOPES, J. C.; DE SOUZA NETO, J. D.; HEBERLE, E. Influência da temperatura e substrato na germinação de sementes de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). **Idesia**, v. 29, n. 1, p. 23-27, 2011.
- ARAUJO, M. D. C. D. R.; CHAGAS, E. A.; GARCIA, M. I. R.; PINTO, S. T. S.; CHAGAS, P. C.; VENDRAME, W.; DE SOUZA, O. M. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media, antioxidants, and levels of agar and pH. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 1771-1780, 2016.
- AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. Ecologia microbiana, p. 117-137, 1998.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, Imprensa Universitária. UFV, v. 2. 1991.
- CARMONA, R.; REZENDE, L. D. P.; PARENTE, T. V. Extração química de sementes de gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, p. 31-11. 1994.
- CASSELLS, A. C. **Problems in tissue culture: culture contamination**. In: Debergh, P. C; Zimmerman, R. M. (edits). Micropropagation. Springer, Dordrecht, p. 31-44, 1991.
- CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jabuticaba trees (*Plinia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 1, 2010.
- CLEMENT, C.R. Melhoria de espécies nativas. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Eds.). In: **Recursos genéticos & melhoramento - plantas**. Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, p. 423-441, 2001.
- CORADIN, L.; SIMINSKI, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região sul. Ministério do Meio Ambiente, 2011.

DANNER, M. A. **Diagnóstico ecogeográfico e caracterização morfogenética de jaboticabeiras**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2009.

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

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JUNIOR, A. D. A.; ASSMANN, A. P.; MAZARO, S. M.; SASSO, S. A. Z. Formação de mudas de jaboticabeira (*Plinia* sp.) em diferentes substratos e tamanhos de recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 179-182, 2007.

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

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, p. 746-753, 2009.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 14, n. 4, p. 335-345, 1981.

DEBERGH, Pierre C.; READ, P. E. **Micropropagation**. In: Micropropagation. Springer, Dordrecht, 1991. p. 1-13.

DOS SANTOS, C. M. R.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 14, p. 13-20, 2004.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Embrapa Florestas - Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, v. 6, n. 1, p. 91-96, 2005.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M., THORPE, T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 32, p. 272-289, 1996.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. Micropropagation: uses and methods. In: **Plant propagation by tissue culture**. Springer, Dordrecht, 2008, p. 29-64.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L.R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L.H.; WILSON P.G.; LUCAS, E. World Checklist of Myrtaceae.

Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. 2015. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/>> acesso em: agosto 2019.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, p. 509-530, 2006.

GROUT, B. W. W. Meristem-tip culture. In: **Plant Cell and Tissue Culture**. Humana Press, v. 6, p. 81-91. 1990.

GURI, A. Z.; PATEL, K. N. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. **U.S. Patent** n. 5,750,402, 1998.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. Prentice-Hall. 2014

HIGA, R. C. V.; MORA, A. L.; HIGA, A. R. Plantio de eucalipto na pequena propriedade rural. **Embrapa**, 2000.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459-1465. 2007.

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

LEITE, A. V.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M.; MAROSTICA JUNIOR, M. R. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2277-2283. 2011.

LEONE, G. F. Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 2013.

LIMA, A. D. J.; CORRÊA, A.; CARVALHO A. A. P.; ABREU, C. M.; DANTAS-BARROS, A. M. Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 58, p. 416-421. 2008.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Woody Plant Medium: A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. **HortScience**, v. 16, p. 453, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, Volume 2. Ed. Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum. 2009.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. Instituto Plantarum, 2005.

MARCHIORI, J.N.C; SOBRAL, M. Dendrologia das Angiospermas: Myrtales. **Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria. 1997.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, v. 65, n. 2, p. 103-111, 1990.

MARQUES JÚNIOR, R. B.; PASQUALOTO CANELLAS, L.; SILVA, L. G. D.; LOPES OLIVARES, F. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1121-1128, 2008.

MATTOS, J. L. R. **Fruteiras nativas do Brasil: jaboticabeiras**. Porto Alegre: Nobel, p. 92. 1983.

MCVAUGH, Rogers. The genera of American Myrtaceae: an interim report. **Taxon**, v. 2, p. 354-418, 1968.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 1, 2004.

MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlin: **Springer-Verlag**, p.109-126. 1997.

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

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2008.

NEVES, C. S. V. J. Sementes recalcitrantes: revisão de literatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 1459-1467, 1994.

NOWAK, J. Benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 34, n. 2, p. 122-130, 1998.

- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.
- OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 793-810, 2000.
- OLTRAMARI, A. C.; DAL VESCO, L. L.; PEDROTTI, E. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 61-68, 2000.
- PANICKER, B.; THOMAS, P.; JANAKIRAM, T.; VENUGOPALAN, R.; NARAYANAPPA, S. B. Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum "Arka Swarna" and activation of endophytic bacteria. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 43, n. 6, p. 614-622, 2007.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.
- PEIXOTO, A. L.; GENTRY, A. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). (Diversity and floristic composition of the "Mata de Tabuleiro" of the Linhares Forest Reserve, Espírito Santo, Brazil.). **Brazilian Journal of Botany**, v. 13, n. 1, p. 19-25, 1990.
- PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. D. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 827-834, 2003.
- PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; DE SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, v. 8, p. 19-23, 2007.
- PILLAY, V. K.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 354-361, 1997.
- PORTES FERRIANI, A.; BORTOLINI, M. F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S. Propagação vegetativa de estaquia de azaléia arbórea (*Rhododendron Thomsonii* HOOK. f.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p. 35-41, 2006.
- POSPÓŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLEČEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 481-497, 1999.
- RAI, M. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2009.

- RASEIRA, M.; ANTUNES, L. E. C.; TREVISAN, R.; GONCALVES, E. D. Espécies frutíferas nativas do Sul do Brasil. **Embrapa Clima Temperado - Documentos** (INFOTECA-E), 2004. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744946/1/documento129.pdf>> acessado: agosto de 2019.
- READ, P. E. Stock plants influence micropropagation success. **Acta Horticulturae**, v. 226, p. 41–52. 1988.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira de Santa Catarina**. Itajaí, p. 1-320. 1978.
- RODRIGUES SALA, V. M.; NOGUEIRA CARDOSO, E. J. B.; FREITAS, J. G. D.; DIAS DA SILVEIRA, A. P. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1099-1106, 2008.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS microbiology letters**, v. 278, p. 1-9, 2008.
- SANTOS, D.T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 1, p. 23-31, 2010.
- SANTOS, R. B.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; & SANTANA, J. R. F. Problemas no cultivo *in vitro*. In: **Cultura de tecidos**. UFLA, Lavras, MG, v. 9, p. 73-79, 2001.
- SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016.
- SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jaboticabeira por enxertia e alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 571-576. 2010.
- SCHWENGBER, J. E.; DUTRA, L.; KERSTEN, É. Efeito do sombreamento da planta matriz e do PVP no enraizamento de estacas de ramos de araçazeiro (*Psidium cattleyanum* Sabine). **Current Agricultural Science and Technology**, v. 6, p.30-34, 2000.
- SILVEIRA, F. T., ORTOLANI, F. A., MATAQUEIRO, M. F., & MORO, J. R. Caracterização citogenética em duas espécies do gênero *Myrciaria*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, p. 327-333. 2006.
- SILVEIRA, S.S. Embriogênese somática em jaboticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts) condições de cultivo *in vitro* e aspectos morfo-histológicos. **Tese de Doutorado em Agronomia-Produção Vegetal**. Universidade Federal do Paraná. 2018.

- SKOOG, F.; MILLER, C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. In: **Symposia of the Society for Experimental Biology**, n. 11, 1957.
- SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. Academic Press, San Diego, CA, p. 231, 2013.
- SOARES-SILVA, L. H. A família Myrtaceae-subtribos: Myrciianae e Eugeniinae na bacia hidrográfica do rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas. 2000.
- SOBRAL, M. Alterações nomenclaturais em *Plinia* (Myrtaceae). **Boletim do Museu Botânico de Curitiba**, Curitiba, n. 63, p. 1-4, 1985.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F. L. E. Myrtaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>> acessado: maio de 2019.
- SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; DONINI, L. P.; DE FARIAS RIBEIRO, M. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2046-2048, 2008.
- SOUZA, L. D. S. D.; FIOR, C. S.; SOUZA, P. V. D. D.; SCHWARZ, S. F. Disinfestation of seeds and *in vitro* multiplication of guabijuzeiro from apical segments juveniles (*Myrcianthes pungens* O. Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 691-697, 2011.
- TEIXEIRA, D. A. Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem (*Puccinia psidii*) e à mancha de *Cylindrocladium candelabrum* mediadas por rizobactérias em *Eucalyptus* spp. Tese de Doutorado. **Universidade Federal de Viçosa**, 2001.
- TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. **Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001.
- THOMAS, P. Isolation of *Bacillus pumilus* from *in vitro* grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 114-123, 2004.
- THORPE, T. A. **The current status of plant tissue culture**. In: Developments in Crop Science (Vol. 19, pp. 1-33). Elsevier, Dordrecht, p.231-270, 1990.
- THORPE, T. A. **Morphogenesis and regeneration**. In: Plant Cell and Tissue Culture. Springer, Dordrecht. p. 17-36, 1994.
- VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. D.; SANO, S. M.; FERREIRA, F. R. Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. **Embrapa Informação Tecnológica**. 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Josue_Junior/publication/265250187_Araca/links/54062bcc0cf2c48563b248f1/Araca.pdf> acessado: agosto de 2019.

VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: In: Plantas Para o Futuro: Região Centro-Oeste. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Livro científico (ALICE)**, 2018. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1073295>> acessado: agosto de 2019.

WAGNER JÚNIOR, A.; DA COSTA E SILVA, J. O.; DUARTE PIMENTEL, L.; MAGALHÃES DOS SANTOS, C. E.; HORST BRUCKNER, C. Germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de jabuticabeira em função do tamanho de sementes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, p. 105-109, 2011.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. **Embrapa Florestas Documentos**, v. 130, p.54, 2006.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, n. 1, p. 3-19, 2005.

CAPÍTULO 1

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E MICROPROPAGAÇÃO DE *Plinia* spp.

RESUMO

As jaboticabeiras (*Plinia* spp.) são árvores frutíferas nativas do Brasil com potencial econômico ainda pouco explorado. Um dos principais problemas para o cultivo das jaboticabeiras é a dificuldade de propagação vegetativa e o fato de ter sementes recalcitrantes. A micropropagação *in vitro* ainda não foi estabelecida para essas frutíferas. Desta forma, os objetivos desse estudo foram: desenvolver um protocolo de germinação de sementes de jaboticabeira *in vitro* e iniciar um protocolo de micropropagação por multiplicação de gemas axilares para as espécies *Plinia peruviana*, *Plinia cauliflora* var. paulista e *Plinia cauliflora* var. sabará. Na germinação *in vitro* foram testados os meios de cultura WPM, WPM/2, MS e MS/2 com sementes de *Plinia peruviana* e *Plinia cauliflora* var. paulista; com sementes de *Plinia cauliflora* var. sabará foram testadas seis concentrações de *Plant Preservative Mixture*TM (PPMTM) (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 ml.L⁻¹) para inibição de crescimento de microrganismos assim como a ausência de nutrientes no meio de cultura e presença de carvão ativado e polivinilpirrolidona-40 em 1 ou 3 g.L⁻¹. Os explantes usados na micropropagação foram segmentos nodais obtidos de plântulas germinadas *in vitro*. Na multiplicação de gemas axilares foi testado o efeito da 6-benzilaminopurina (BAP) (0; 2,22; 4,44; 6,66; 8,88 µM) para as três espécies e da cinetina (0; 2,33; 4,65; 6,97; 9,30 µM na presença ou ausência de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado (CA)) para *Plinia cauliflora* var. sabará. Nos meios WPM e MS/2, a taxa de germinação foi de 40%, significativamente maior que no meio MS; porém, outras variáveis não diferiram significativamente. A adição de 3 g.L⁻¹ de CA permitiu um aumento da taxa de germinação (95%), redução da oxidação do meio (20%), aumento do tamanho da parte aérea (6,18 cm) e do índice de velocidade de germinação (IVG) em relação ao mesmo meio sem adição de CA. O PPMTM foi eficiente no controle de microrganismos endofíticos na concentração de 1,0 ml.L⁻¹. A adição de BAP em concentração 4,4 µM resultou em maior multiplicação e tamanho médio de brotos para as espécies *Plinia peruviana* (taxa de 1,88 em dois meses e brotos de 6,50 mm por explante) e *Plinia cauliflora* var. paulista (taxa de 2,43 em dois meses e brotos de 10,53 mm por explante). As citocininas testadas não afetaram a multiplicação da espécie *Plinia cauliflora* var. sabará e nos meios de cultura contendo CA, foram obtidas as menores médias em comparação com o meio controle. Em suma, foi desenvolvido um protocolo eficiente de germinação *in vitro* com o uso do meio WPM adicionado de 3 g.L⁻¹ de CA e 1,0 ml.L⁻¹ de PPMTM. Porém, a multiplicação das jaboticabeiras é baixa e ocorre de forma lenta.

Palavras-chave: cultura de tecidos; jaboticaba de cabinho; jaboticaba paulista; jaboticaba sabará; uva brasileira.

ABSTRACT

Jaboticaba trees (*Plinia* spp.) are native fruit trees of Brazil with economic potential and underexplored. One of the main problems for jaboticaba cultivation is the difficulty of vegetative propagation and the recalcitrance of its seeds. *In vitro* micropropagation of this fruit tree has not yet been established. Thus, the purposes of this study were: to initiate an axillary bud multiplication protocol for *Plinia peruviana*, *Plinia cauliflora* var. paulista and *Plinia cauliflora* var. sabará and to develop an *in vitro* seed germination protocol for jaboticaba. *In vitro* germination the effect of culture media (WPM, WPM/2, MS and MS/2) with seeds of *Plinia peruviana* and *Plinia cauliflora* var. paulista; with seeds of *Plinia cauliflora* var. sabará six concentrations of Plant Preservative Mixture™ (PPM™) (0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0; 16.0 ml.L⁻¹) were tested to inhibit growth of microorganisms; as well as the effect of absence of nutrients in the culture medium and the presence of activated carbon and polyvinylpyrrolidone 40 in 1 or 3 g.L⁻¹. The explants used in micropropagation were nodal segments obtained from *in vitro* germinated seedlings. For the multiplication of axillary buds, 6-benzylaminopurine (0; 2.22; 4.44; 6.66; 8; 88 µM) for the three species and kinetin (0; 2.33; 4.65; 6.97; 9.30 µM) was tested in the presence or absence of 1 g.L⁻¹ activated carbon (AC) for *Plinia cauliflora*. On WPM and MS/2 media, the seeds presented a germination rate of 40%, significantly higher than on MS medium; other variables did not vary significantly. The addition of 3 g.L⁻¹ of AC had a positive effect on germination rate (95%), reduced medium oxidation (20%), raised shoot size (6.18 cm) and germination speed index (IVG) in relation to the same medium without AC addition. PPM™ was efficient in controlling microorganisms at a concentration of 1.0 ml.L⁻¹. BAP at 4.4 µM resulted in increased multiplication rates and shoot size for *Plinia peruviana* (rate of 1.88 in two months and shoots of 6.50 mm) and *Plinia cauliflora* var. paulista (rate of 2.43 in two months and shoots with 10.53 mm). The cytokinins tested did not affect the multiplication of *Plinia cauliflora* var. sabará. When AC was added to culture medium, all variables presented lower means than in its absence. In conclusion, an efficient protocol was developed for *in vitro* germination with WPM medium added of 3 g.L⁻¹ AC and 1.0 ml.L⁻¹ of PPM™. However, the *in vitro* multiplication of jaboticaba trees is low and occurs slowly.

Key-words: brazilian-grape; jaboticaba de cabinho; jaboticaba paulista; jaboticaba sabará; tissue culture.

1 INTRODUÇÃO

As jaboticabeiras (*Plinia* spp., Myrtaceae) são árvores frutíferas nativas do Brasil que produzem um dos frutos mais populares dos pomares caseiros, a jaboticaba (MATTOS, 1983). Devido ao seu sabor adocicado e à cor roxa da casca, a jaboticaba é conhecida internacionalmente como “*brazilian grape*”, a uva brasileira. Seu consumo é feito principalmente *in natura*, mas ela também pode ser industrializada em suco, sorvete, geleia e bebidas alcóolicas (DEMATTE, 1996). A polpa é rica em vitamina C e minerais, enquanto sua casca apresenta altos teores de antocianina, um composto fenólico com alta atividade antioxidante e anti-inflamatória (KONG et al., 2003; SANTOS et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011). A partir das folhas é possível extrair óleos essenciais de interesse cosmético e farmacológico (VILA, 2010; APEL et al., 2005). As espécies mais cultivadas são *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, conhecida como “jaboticaba de cabinho” e *Plinia cauliflora* (DC.) Berg. Esta última possui duas variedades, a “jaboticaba paulista” e a “jaboticaba sabará”. Anteriormente, a sabará era classificada como *Plinia jaboticaba* mas atualmente é considerada sinônimo de paulista (SOBRAL et al., 2015).

A exploração das jaboticabeiras é feita em grande parte de forma extrativista; a produção de jaboticaba em larga escala enfrenta problemas, principalmente devido a sua não domesticação (CITADIN et al., 2010). A propagação dessas espécies é realizada principalmente por sementes, as quais são recalcitrantes e limitam a produção de mudas em épocas de frutificação, pois só podem ser armazenadas por um curto período (NEVES, 1994; DANNER et al., 2011). A capacidade de germinação das sementes é afetada quando sua umidade é menor que 30%, de forma que seu armazenamento por períodos maiores que 30 dias resulta em ausência completa de germinação (VALIO e FERREIRA, 1992). Métodos de propagação vegetativa clássicos, como a estaquia, alporquia e enxertia, produzem mudas com custo elevado, desestimulando o estabelecimento de grandes pomares comerciais (SASSO et al., 2010). A estaquia tem baixo sucesso no enraizamento dos propágulos, menor que 40% (PEREIRA et al., 2005). A alporquia e enxertia apresentam resultados bastante variáveis de acordo com a época do ano (CASSOL et al., 2015; DUARTE e PAULL, 2015). Desse modo, o desenvolvimento de técnicas de propagação assexuada para as jaboticabeiras é atualmente necessário para a produção massal de mudas de qualidade.

A micropropagação é uma alternativa para espécies com sementes recalcitrantes que são difíceis de propagar por métodos tradicionais. Entre as técnicas usadas na cultura de tecidos, a multiplicação de gemas axilares é o método mais simples e utilizado comercialmente (GEORGE et al., 2008). Esta técnica possibilita a produção massal de mudas de alto padrão fitossanitário, em curto espaço de tempo, podendo ser associada a genótipos de interesse comercial (HARTMANN e KESTER, 2014). Na multiplicação de gemas axilares utiliza-se como explantes segmentos nodais da planta de interesse, que são cultivados na presença de citocininas para provocar a multiplicação de brotos (OLIVEIRA et al., 2013). Durante a etapa de multiplicação geralmente se avalia a resposta dos explantes ao tratamento com reguladores vegetais e a taxa de multiplicação de brotos e gemas, entre outras variáveis. A utilização de explantes jovens de alta qualidade fitossanitária é fundamental para o sucesso da técnica, pois, respondem de forma mais eficiente ao tratamento com reguladores vegetais (DUMAS e MONTEUUIS, 1995).

A germinação de sementes *in vitro* é um método eficiente e amplamente utilizado na cultura de tecidos para a obtenção de explantes jovens e saudáveis (DEBERGH e READ, 1991). Para diminuir a possibilidade de contaminação das plântulas *in vitro* é possível adicionar biocidas ao meio de cultura, como por exemplo o *Plant Preservative Mixture*TM (PPMTM), que combate microrganismos epifíticos e endofíticos. Além disso, para evitar o escurecimento do meio e oxidação das plântulas devido a compostos fenólicos que podem ser liberados pelas sementes *in vitro*, é possível utilizar o carvão ativado (CA) e o polivinilpirrolidona (PVP) no meio.

Estudos de micropropagação com o gênero *Plinia* são escassos. Até o atual momento não foram encontrados relatos de micropropagação por multiplicação de gemas axilares para as espécies *P. peruviana* e *P. cauliflora*. Portanto, os objetivos desse trabalho foram, em primeiro lugar, estabelecer um protocolo de germinação *in vitro* de sementes de jabuticabeira para obtenção de explantes jovens e saudáveis. Em segundo lugar, iniciar um protocolo de micropropagação por multiplicação de gemas axilares de segmentos nodais para *P. peruviana* e *P. cauliflora* var. paulista e sabará.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba (Paraná, Brasil). Para os testes de germinação *in vitro* foram utilizadas sementes de frutos maduros. A coleta dos frutos de *P. cauliflora* (var. paulista) foi realizada em uma única árvore localizada em Vitorino (Paraná, Brasil) (26°19'0,9" S 52°46'42" W), em um remanescente de Floresta Ombrófila Mista. As jaboticabas da espécie *P. peruviana* foram cedidas por um pomar particular localizado em Curitiba (25°23'53.8"S 49°19'04.5"W), oriundas de uma única árvore. Os frutos de *P. cauliflora* (var. sabará) foram adquiridos no Mercado Municipal de Curitiba, provenientes de um produtor do município de Casa Branca (São Paulo, Brasil). Em todos os testes de multiplicação foram utilizados como explantes segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo duas gemas axilares opostas. Os segmentos nodais foram obtidos de plântulas germinadas *in vitro* com aproximadamente 10 cm de comprimento, das quais o último segmento contendo a gema apical caulinar foi descartado.

2.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

2.2.1 Desinfestação e condições de cultura

As sementes foram extraídas manualmente dos frutos e em seguida foi realizada a retirada da mucilagem por meio de fricção em tecido de algodão. Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente por pelo menos 12 h para secagem. A desinfestação foi feita em câmara de fluxo laminar, com as sementes sendo imersas em 70% de álcool etílico por um minuto, 5% de hipoclorito de sódio com 0,01% de Tween-20® por 10 minutos e enxaguadas seis vezes com água destilada autoclavada (DA). Após a desinfestação, foram mantidas em água DA com 1 g.L⁻¹ de polivinilpirrolidona 40 (PVP) para evitar oxidação até a inoculação no meio de cultura.

As sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio com 15 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro contendo 10 ml de meio de cultura, fechados com

tampa de polipropileno e plástico filme de PVC. As formulações de meio de cultura variaram entre os diferentes experimentos, no entanto, para todos os testes foi usado meio semi-sólido (6 g.L^{-1} de ágar Kasvi®), com o pH ajustado a 5,8 antes da adição de ágar e de ser autoclavado a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento a $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sob luz LED branca de aproximadamente $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. Os explantes foram subcultivados a cada 30 dias.

2.2.2 Meios de cultura na germinação de sementes *Plinia cauliflora* var. paulista e *Plinia peruviana*

Foram testadas quatro formulações de meio de cultura na germinação *in vitro* de sementes de *P. cauliflora* var. paulista e *P. peruviana*: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS com a metade das concentrações dos sais (MS/2), *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD e McCOWN, 1980) e WPM/2 (Anexo 1). As vitaminas utilizadas foram as respectivas de cada formulação e não foram reduzidas nos meios MS/2 e WPM/2. Todos os tratamentos foram adicionados de 1 ml.L^{-1} de *Plant Preservative Mixture*™ (PPM™). O experimento foi realizado com 10 repetições de oito sementes por tratamento. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de germinação (emissão da radícula), porcentagem de contaminação (de fungos e bactérias), porcentagem de oxidação do meio de cultura (escurecimento do meio) e também foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG) conforme Maguire (1962). As avaliações foram feitas considerando as sementes não contaminadas. Os dados apresentados são referentes a avaliação de 120 dias.

2.2.3 Carvão ativado, polivinilpirrolidona-40 e meio de cultura na germinação de sementes de *Plinia cauliflora* var. sabará

O efeito do carvão ativado, do PVP e da ausência de nutrientes no meio de cultura foi avaliado na germinação *in vitro* de sementes de *P. cauliflora* var. sabará. Foram estabelecidos seis tratamentos: meio composto apenas por água destilada e ágar (1); meio WPM (2); WPM + 1 g.L^{-1} de PVP 40 (3); WPM + 3 g.L^{-1} de PVP 40 (4); WPM + 1 g.L^{-1} de carvão ativado (CA) (5); WPM + 3 g.L^{-1} de CA (6). Todos os tratamentos receberam 1 ml.L^{-1} de PPM™, cada um com 10 repetições de quatro

sementes em tubos de ensaio. As variáveis analisadas foram: porcentagem de germinação, porcentagem de oxidação, tamanho da parte aérea e IVG. Os resultados são referentes a avaliação de 35 dias.

2.2.4 PPM™ na germinação de sementes de *Plinia cauliflora* var. *sabará*

Foi avaliado o efeito de seis concentrações de PPM™ (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 ml.L⁻¹) adicionado ao meio de cultura, sobre a germinação *in vitro* de sementes de *P. cauliflora* var. *sabará*. O meio utilizado foi o WPM adicionado de 1 g.L⁻¹ de PVP 40. Foram estabelecidas 10 repetições para cada tratamento e quatro sementes por repetição. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de germinação, porcentagem de contaminação, tamanho médio da raiz e tamanho da parte aérea. Os dados expostos são relativos a avaliação de 35 dias.

2.3 MULTIPLICAÇÃO

2.3.1 Condições de cultura

Os segmentos foram introduzidos ao acaso em frascos de vidro com 8 cm de diâmetro e 10 cm de altura, fechados com tampa rígida de polipropileno e filme de PVC. O meio de cultura utilizado nos experimentos de multiplicação foi o WPM (40 ml por frasco), acrescido de 6 g.L⁻¹ de ágar Kasvi® e 30 g.L⁻¹ de sacarose, com o pH ajustado a 5,8 antes de ser autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Outros componentes adicionados ao meio de cultura variaram nos diferentes experimentos. Em todos os experimentos de multiplicação, os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento a 24 ± 2 °C no escuro durante a primeira semana, para evitar a oxidação. Em seguida, foram transferidos para luz LED branca de aproximadamente 30 µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

2.3.2 Multiplicação de *Plinia cauliflora* var. *paulista* e *Plinia peruviana*

A multiplicação de gemas axilares de *P. cauliflora* var. *paulista* e *P. peruviana* foi realizada em meio WPM com 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações 2,22; 4,44; 6,66; 8,88 µM, além de um tratamento controle (sem regulador vegetal). Todos

os meios de cultura foram adicionados de 1 ml.L⁻¹ de PPM™. Foram realizadas oito repetições por tratamento, cada uma compreendendo cinco segmentos nodais. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de explantes com brotos (que geraram brotos), taxa de multiplicação de brotos (dada pela razão entre o número de brotos formados após 60 dias pela quantidade de explantes responsivos) e tamanho médio dos brotos (cm). Os dados apresentados são referentes aos 60 dias de multiplicação.

2.3.3 Multiplicação de *Plinia cauliflora* var. *sabará*

Para a multiplicação da espécie *P. cauliflora* var. *sabará*, foram testadas BAP e cinetina (KIN), na presença ou ausência de 1 g.L⁻¹ de CA, nas concentrações de 2,22; 4,44; 6,66; 8,88 µM e 2,33; 4,65; 6,97; 9,30 µM respectivamente, além do tratamento controle sem citocinina, em meio WPM. O PPM™ foi adicionado em todos os meios de cultura, 3 ml.L⁻¹ naqueles adicionados de CA e 1 ml.L⁻¹ na ausência. Foram definidas oito repetições por tratamento, cada qual com seis segmentos nodais. As variáveis analisadas foram: porcentagem de explantes responsivos, taxa de multiplicação de brotos, taxa de multiplicação de gemas (dada pela razão entre o número de gemas formadas e o número de explantes com brotos) e tamanho médio dos brotos (em milímetros). Os resultados apresentados correspondem a avaliação de 60 dias.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados seguindo o delineamento inteiramente casualizado (DIC). A análise dos resultados foi efetuada por análises de Deviance ou de variância para o modelo que considerou o efeito de tratamentos. As variáveis binárias foram analisadas por modelos lineares generalizados com distribuição de probabilidade binomial. As variáveis contínuas foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) com distribuição de probabilidade normal. Quando os dados da variável não apresentaram normalidade, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. As comparações entre médias foram feitas pelo teste de Tukey ou Scott-Knott com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no ambiente R versão 3.6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

3.1.1 Efeito dos meios de cultura na germinação de sementes de *Plinia cauliflora* var. paulista e *Plinia peruviana*

A germinação variou significativamente em função dos tratamentos para a espécie *P. cauliflora* var. paulista (Tabela 1). As sementes inoculadas nos meios WPM e MS/2 apresentaram medias maiores de germinação em relação ao meio MS, 40% contra 21%. Os meios com menor concentração de sais influenciaram positivamente a germinação das sementes. A disponibilidade de água nos meios de cultura menos concentrados é maior devido a menor pressão osmótica (TAIZ E ZEIGER, 2004). As demais variáveis avaliadas para esta espécie não diferiram estatisticamente. A contaminação variou entre 27 a 40%, devido principalmente à presença de bactérias. A oxidação do meio de cultura foi maior que 80% em todos os tratamentos, podendo ter prejudicado a taxa de germinação. O acúmulo de compostos fenólicos no meio é prejudicial para as sementes devido a sua fitotoxicidade (TITOV et al., 2006).

Nos testes com *P. peruviana*, efeito significativo dos tratamentos foi verificado apenas para a variável oxidação dos meios (Tabela 1). A oxidação do meio MS foi menor que a do meio WPM/2, 7% contra 28% respectivamente. Picolotto et al. (2007) obtiveram resultados diferentes com uma jabuticabeira não identificada: a taxa de oxidação no meio foi de 80% e não houve germinação em meio MS. Apesar da taxa de oxidação ter sido menor nos tratamentos com *P. peruviana*, o mesmo ocorreu com as taxas de germinação. Desta forma, a oxidação possivelmente não foi o único fator responsável pela baixa taxa de germinação nesta espécie (25%).

As taxas de germinação obtidas para *P. cauliflora* var. paulista e *P. peruviana* foram superiores às encontradas por Picolotto et al. (2007), onde os autores observaram apenas 8% de germinação de sementes de *Plinia* spp. na ausência de luz e 0% em fotoperíodo de 16h, em meio MS.

Comparando as duas espécies, observou-se comportamentos diferentes em relação às variáveis analisadas. É possível que o comportamento das sementes de jabuticabeira na germinação *in vitro* depende do genótipo de forma considerável. Em estudos com Myrtaceae, é notável a ausência de um padrão em relação a germinação

de sementes *in vitro*. Martinotto et al. (2007) observaram germinação de 90% em meio MS para a cagaiteira (*Eugenia dysenterica*), enquanto Souza et al. (2011) obtiveram 98% de germinação no meio WPM no estudo com o guabijuzeiro (*Myrcianthes pungens*).

TABELA 1 – EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO, CONTAMINAÇÃO, OXIDAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E IVG EM SEMENTES GERMINADAS *IN VITRO* DE *Plinia cauliflora* VAR. PAULISTA E *Plinia peruviana*, APÓS 120 DIAS

MEIO	GERMINAÇÃO* (%)		CONTAMINAÇÃO (%)		OXIDAÇÃO (%)		IVG	
	sp. 1	sp. 2	sp. 1	sp. 2	sp. 1	sp. 2	sp. 1	sp. 2
WPM	40,0 a ±13,6	10,0 ^{ns} ±7,1	30,0 ^{ns} ±9,1	5,0 ^{ns} ±6,5	92,5 ^{ns} ±6,5	12,5 ab ±12,1	0,07 ^{ns} ±0,03	0,02 ^{ns} ±0,01
WPM _{1/2}	38,8 ab ±14,4	25,0 ^{ns} ±6,3	40,0 ^{ns} ±17,1	1,2 ^{ns} ±2,4	83,8 ^{ns} ±14,2	28,8 a ±11,0	0,10 ^{ns} ±0,06	0,04 ^{ns} ±0,02
MS	21,2 b ±9,0	13,8 ^{ns} ±7,7	27,5 ^{ns} ±10,2	5,0 ^{ns} ±5,4	0,86 ^{ns} ±7,7	7,5 b ±6,5	0,06 ^{ns} ±0,03	0,03 ^{ns} ±0,02
MS _{1/2}	40,0 a ±8,0	15,0 ^{ns} ±9,5	36,2 ^{ns} ±8,5	6,2 ^{ns} ±4,1	93,8 ^{ns} ±5,5	17,5 ab ±9,8	0,12 ^{ns} ±0,03	0,03 ^{ns} ±0,02

FONTE: o autor (2019).

NOTA: sp. 1: *Plinia cauliflora* var. paulista; sp. 2: *Plinia peruviana*; “_{1/2}”: meia força. *Taxa de germinação. ±: desvio padrão. Dados seguidos de letras distintas entre si dentro das colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

3.1.2 Efeito do carvão ativado, polivinilpirrolidona-40 e meio de cultura na germinação de sementes de *Plinia cauliflora* var. sabará

As análises mostraram que houve efeito significativo dos tratamentos para todas as variáveis (Tabela 2). A taxa de germinação e o IVG do tratamento sem nutrientes foram muito próximos dos obtidos no meio WPM sem adsorventes. Porém, o desenvolvimento da plântula no meio contendo apenas água foi visualmente afetado, grande parte das plântulas não emitiram o primeiro par de folhas e outras pareciam atrofiadas (Figura 1-A).

Os meios de cultura adicionados com 1 ou 3 g.L⁻¹ de CA apresentaram maiores porcentagens de germinação, IVG e menores porcentagens de oxidação em relação aos meios sem adsorvente. O tamanho da parte aérea foi maior na presença de 3 g.L⁻¹ de CA.

O uso de CA na germinação *in vitro* de jabuticabeira ainda não havia sido relatado, entretanto, seus benefícios já foram amplamente verificados na germinação de sementes de orquídeas (PACEK-BIENIEK et al., 2010; SHIN et al., 2011; BEKTAŞ et al., 2013). É provável que o efeito positivo do CA na germinação, no tamanho da

parte aérea e raiz seja consequência da redução de compostos inibitórios que se acumulam no meio de cultura. Compostos fenólicos têm ação fitotóxica e o CA é capaz de adsorvê-los quando são exsudados por tecidos submetidos a estresse fisiológico (THOMAS, 2008).

O tratamento com 1 g.L⁻¹ de PVP causou aumento no tamanho da parte aérea em relação ao meio formado apenas por água. Assim como o CA, o PVP também é capaz de adsorver compostos tóxicos e inibitórios que se acumulam no meio de cultura (AHMAD et al., 2013). O PVP não teve efeito significativo nas outras variáveis. Entretanto, sua utilização na germinação *in vitro* de espécies arbóreas já foi relatada de forma positiva para *Boswellia serrata* (200 mg.L⁻¹) (GHORPADE et al., 2010) e *Taxus baccata* (800 mg.L⁻¹) (TAFRESHI et al., 2011).

TABELA 2 – EFEITO DO CARVÃO ATIVADO, DA POLIVINILPIRROLIDONA-40 E DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES, OXIDAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E TAMANHO DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DE *Plinia cauliflora* VAR. SABARÁ

TRATAMENTO	GERMINAÇÃO* (%)	OXIDAÇÃO (%)	TPA (cm)	IVG
Água	62,5±16,7 b	75,0±16,3 a	1,17±0,50 c	0,043±0,015 b
WPM	65,0±10,8 b	62,5±18,3 a	4,09±0,93 bc	0,045±0,011 b
WPM+PVP 1 g.L ⁻¹	77,5±18,6 ab	47,5±11,4 ab	4,52±0,78 b	0,051±0,014 ab
WPM+PVP 3 g.L ⁻¹	82,5±14,7 ab	32,5±12,8 ac	4,41±0,64 bc	0,057±0,015 ab
WPM+CA 1 g.L ⁻¹	97,5±4,9 a	22,5±8,8 bc	5,65±1,14 b	0,073±0,008 a
WPM+CA 3 g.L ⁻¹	95,0±9,8 a	20,0±6,5 c	6,18±0,54 a	0,078±0,014 a

FONTE: o autor (2019).

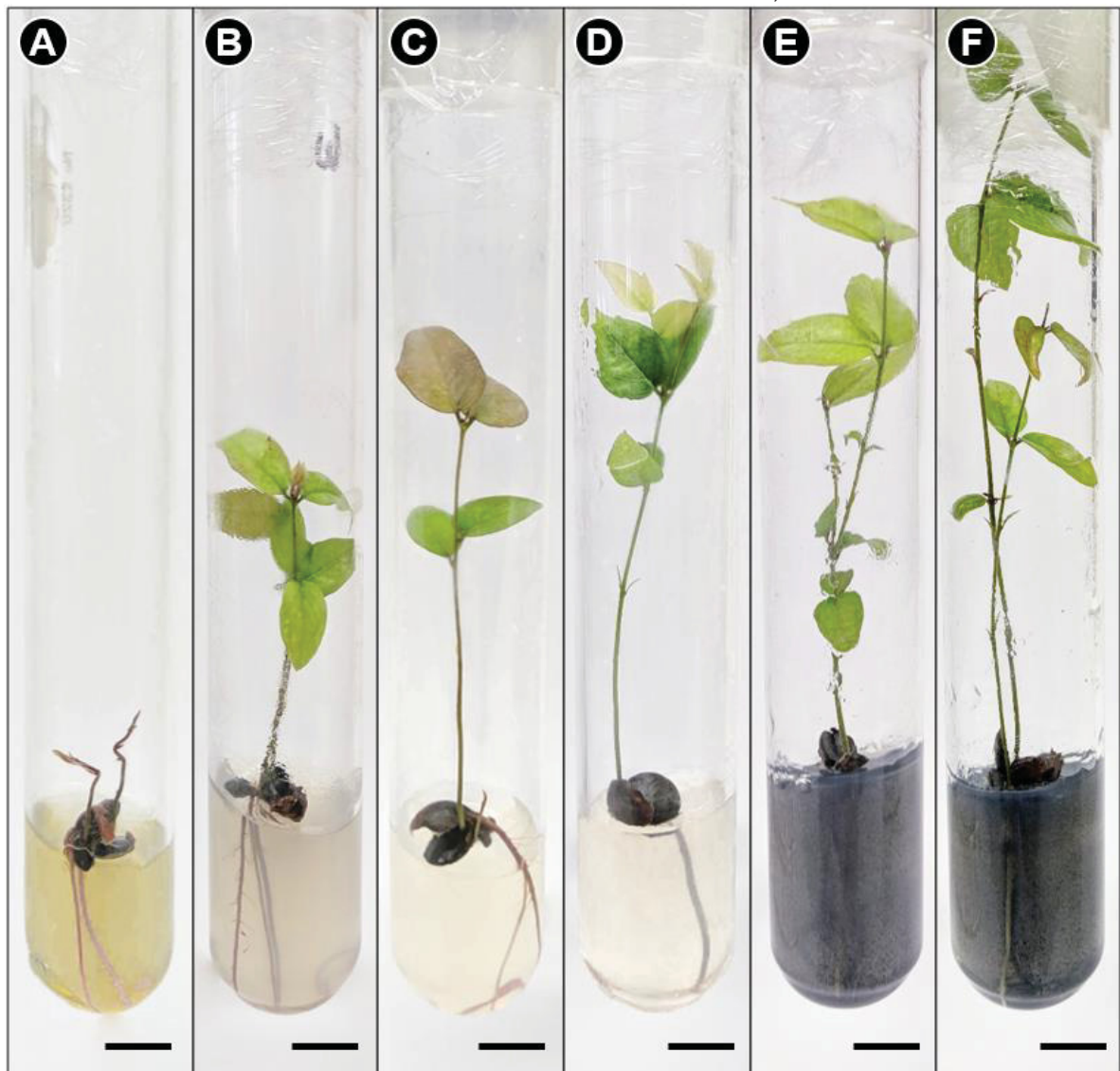
NOTA: *Taxa de germinação. TPA: tamanho da parte aérea; IVG: índice de velocidade de germinação. Dados seguidos de letras distintas entre si dentro das colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

3.1.3 Efeito do PPMTM na germinação de sementes de *Plinia cauliflora* var. sabará

Houve efeito significativo dos tratamentos para todas as variáveis (Tabela 3). As concentrações do PPMTM entre 0,5 e 4,0 ml.L⁻¹ não afetaram a germinação das sementes em comparação ao controle. A partir de 8,0 ml.L⁻¹, a taxa de germinação foi inferior e apenas 15% das sementes germinaram no tratamento com 16,0 ml.L⁻¹ (Tabela 3). Estudos sobre a fitotoxicidade desse biocida, formado de metilisotiazolinona (C₄H₅NOS) e clorometilisotiazolinona (C₄H₄ClNOS), na germinação de sementes são escassos. De acordo com o fabricante, o PPMTM atua na parede celular da bactéria ou fungo e inibe a atividade de enzimas do ciclo do ácido cítrico e da cadeia de transporte de elétrons, assim como inibe transporte de monossacarídeos e aminoácidos do meio para as células dos microrganismos (Plant Cell Technology,

Inc.). De acordo com Niedz (1998) o uso do PPM™ em concentrações até 2,0 ml.L⁻¹ não afetaram o desenvolvimento de plântulas de duas espécies de *Citrus* spp. Na germinação de sementes sintéticas de *Cannabis sativa* (LATA et al., 2009) e *Malus pumila* (MICHELI et al., 2001), o uso do PPM™ nas concentrações de 0,75 e 5,0 ml.L⁻¹ não causou efeitos fitotóxicos.

FIGURA 1 – DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Plinia cauliflora* VAR. SABARÁ EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POLIVINILPIRROLIDONA-40 E CARVÃO ATIVADO, AOS 35 DIAS



FONTE: o autor (2019).

NOTA: A: água e ágar; B: WPM; C: WPM+PVP 1 g.L⁻¹; D: WPM+PVP 3 g.L⁻¹; E: WPM+CA 1 g.L⁻¹; F: WPM+CA 3 g.L⁻¹. Barra: 1 cm.

O tratamento com 0,5 ml.L⁻¹ ou a ausência do PPM™ resultaram em altas taxas de contaminação, de 30 a mais de 50% respectivamente. A manifestação de microrganismos no meio foi controlada de modo efetivo a partir do tratamento com 1,0

ml.L⁻¹ do biocida. A partir da concentração de 4,0 ml.L⁻¹, a taxa de contaminação foi nula; entretanto, houve efeito negativo sobre o desenvolvimento da radícula.

Segundo as instruções do fabricante, para a germinação de sementes *in vitro* é sugerido o uso de 0,5 a 2,0 ml.L⁻¹ de PPM™ no meio de cultura (Plant Cell Technology, Inc.). No entanto, o PPM™ afetou negativamente o comprimento médio das raízes em concentrações iguais ou superiores a 1,0 ml.L⁻¹ (Figura 2). A partir de 4,0 ml.L⁻¹, o tamanho médio das raízes foi menor que 1,1 cm, enquanto em concentrações menores do biocida foi maior que 5,3 cm. O tamanho da parte aérea sofreu redução em concentrações $\geq 8,0$ ml.L⁻¹.

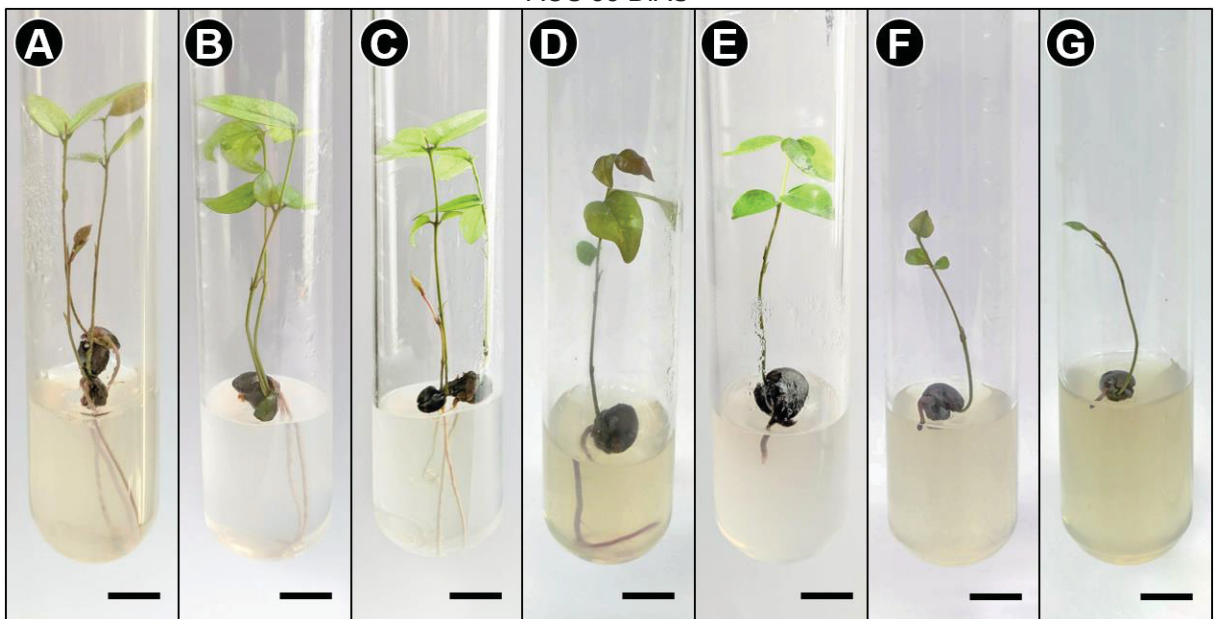
TABELA 3 – EFEITO DO *PLANT PRESERVATIVE MIXTURE*™ NA GERMINAÇÃO E CONTAMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Plinia cauliflora* VAR. SABARÁ, E NO TAMANHO DA RAIZ E DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS

PPM™ (ml.L ⁻¹)	GERMINAÇÃO (%)	CONTAMINAÇÃO (%)	TMR (cm)	TPA (cm)
0,0	82,5±12,8 a	52,5±17,1 a	7,42±0,86 a	4,59±0,56 a
0,5	77,5±11,4 ab	30,0±12,2 a	7,23±1,18 a	4,74±0,73 a
1,0	70,0±20,4 ab	2,5±4,9 b	5,79±0,66 b	3,87±0,72 a
2,0	65,0±10,8 ab	2,5±4,9 b	5,39±1,14 b	4,29±0,74 ab
4,0	62,5±15,1 ab	0,0±0,0 b	1,07±0,34 c	4,12±0,71 ab
8,0	57,5±16,4 b	0,0±0,0 b	0,69±0,23 c	3,23±0,60 bc
16,0	15,0±16,7 c	0,0±0,0 b	0,19±0,16 d	1,26±1,07 c

FONTE: o autor (2019).

NOTA: TMR: tamanho médio da raiz; TPA: tamanho da parte aérea. Dados seguidos de letras distintas entre si dentro das colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

FIGURA 2 – DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Plinia cauliflora* VAR. SABARÁ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE *PLANT PRESERVATIVE MIXTURE*™ NO MEIO DE CULTURA, AOS 35 DIAS



FONTE: o autor (2019).

NOTA: A-G: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 ml.L⁻¹ PPM™. Barra: 1 cm.

3.2 MULTIPLICAÇÃO

3.2.1 Multiplicação de *Plinia cauliflora* var. paulista e *Plinia peruviana*

Todas as variáveis analisadas diferiram significativamente em função dos tratamentos (Tabela 4). Para ambas as espécies, o tratamento com 4,4 μM de BAP resultou em mais de 80% de segmentos responsivos; os outros tratamentos não diferiram do controle. Durante o experimento foi observado crescimento de bactérias endofíticas em todos os tratamentos, em pequenas taxas, porém, de forma persistente.

A multiplicação de brotos nas duas espécies foi maior no tratamento com 4,4 μM de BAP. Para *P. cauliflora* var. paulista, os outros tratamentos não diferiram do controle. Já para *P. peruviana*, as concentrações de 6,66 e 8,88 μM de BAP tiveram efeito negativo sobre a multiplicação de brotos, ocasionando uma taxa de multiplicação menor que a do controle. Rai et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes na micropropagação de *Psidium guajava*, usando meio de cultura MS com 4,44 μM de BAP, e observaram 91% de responsividade e 2,45 brotos por explante. Gomes e Canhoto (2003) utilizando menor concentração de BAP (0,9 μM) e 0,05 μM de ácido 1-naftalenoacético (ANA) em meio MS meia força, conseguiram multiplicação de 2,25 brotos para *Eucalyptus nitens*. Entretanto, esses resultados foram baixos em comparação a multiplicação de brotos verificada para outras espécies de Myrtaceae. Oliveira et al. (2010) obtiveram 5,5 brotos por segmento em meio WPM com 0,55 μM de BAP para *Melaleuca alternifolia*. Outros autores utilizaram combinações de BAP com outras auxinas. Brondani et al. (2012) conseguiram mais de 10 brotos na multiplicação de duas linhagens de *Eucalyptus benthamii* em meio WPM com 2,22 μM de BAP e 0,27 μM de ANA; Youssef et al. (2010) obtiveram mais de 76 brotos por explante usando 17,76 μM de BAP e 2,28 μM de ácido 3-indolacético (AIA) em meio MS para *Psidium guajava*. Nota-se que a concentração de BAP usada na multiplicação de brotos é bastante variável na família Myrtaceae. A ausência de estudos de micropropagação com jaboticabeira leva a utilização de concentrações de BAP de referência para outras espécies de Myrtaceae, as quais podem não ser as ideais para a multiplicação das jaboticabeiras.

O tratamento com 4,4 μM de BAP também apresentou melhor resultado em relação ao tamanho médio dos brotos para as duas espécies. No ensaio com *P. cauliflora* var. paulista, os resultados dos outros tratamentos não diferiram entre si. Para *P. peruviana*, os tratamentos com 6,66 e 8,88 μM de BAP não diferiram do controle. O tamanho médio dos brotos observado para essas espécies foi pequeno comparado ao de *Syzygium cuminii*. Yadav et al. (1990) observaram brotos de 5,5 cm usando 4,5 μM de BAP. Dessa forma, verificou-se que a multiplicação e desenvolvimento dos brotos dessas jaboticabeiras ocorreu de forma lenta para as concentrações de BAP testadas.

TABELA 4 – EFEITO DA 6-BENZILAMINOPURINA NA MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES EM SEGMENTOS NODAIS DE *Plinia cauliflora* VAR. PAULISTA E *Plinia peruviana* APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM.

BAP (μM)	SEGMENTOS RESPONSIVOS (%)		MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS*		TAMANHO MÉDIO DOS BROTOS (mm)	
	sp. 1	sp. 2	sp. 1	sp. 2	sp. 1	sp. 2
0	45,0 \pm 10,0 b	40,0 \pm 13,0 b	1,21 \pm 0,16 b	1,41 \pm 0,32 b	4,48 \pm 0,73 b	4,40 \pm 0,99 c
2,22	55,0 \pm 12,0 b	48,0 \pm 13,0 b	1,12 \pm 0,17 b	1,38 \pm 0,31 b	4,54 \pm 1,10 b	6,68 \pm 1,02 b
4,44	85,0 \pm 6,0 a	83,0 \pm 5,0 a	1,88 \pm 0,27 a	2,43 \pm 0,33 a	6,50 \pm 1,04 a	10,53 \pm 2,75 a
6,66	48,0 \pm 7,0 b	33,0 \pm 13,0 b	1,35 \pm 0,33 b	0,81 \pm 0,37 c	3,63 \pm 0,61 b	5,08 \pm 1,70 bc
8,88	48,0 \pm 13,0 b	28,0 \pm 17,0 b	1,26 \pm 0,28 b	0,75 \pm 0,45 c	4,35 \pm 0,72 b	4,40 \pm 2,50 c

FONTE: o autor (2019).

NOTA: *Taxa de multiplicação. Sp. 1: *Plinia cauliflora* var. paulista; sp. 2: *Plinia peruviana*. Segmentos responsivos: porcentagem de segmentos que desenvolveram brotos. Dados seguidos de letras distintas entre si dentro das colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

3.2.2 Multiplicação de *Plinia cauliflora* var. sabará

Todas as variáveis diferiram significativamente em relação ao fator concentração de citocinina (Tabela 5). Na ausência do CA nenhum tratamento apresentou média maior que o controle para todas as variáveis analisadas. Quanto ao fator presença ou ausência do CA, as médias do tratamento controle foram menores para todas as variáveis na presença do CA. Desta forma, a presença de citocininas e CA, nas concentrações testadas, não foi eficiente na fase de multiplicação desta espécie.

A resposta dos explantes variou entre 35% (BAP 4,44 μM) e 90% (KIN 4,65 μM e controle) aproximadamente nas maiores médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, na ausência de CA. Os tratamentos com concentrações elevadas de citocinina (8,88 μM de BAP e 9,30 μM de KIN) reduziram a porcentagem de ormação

de brotos. O CA teve efeito negativo sobre a resposta dos explantes no controle e nos tratamentos com 2,22 μM de BAP e 4,65 μM de KIN em relação aos mesmos tratamentos na sua ausência. A resposta variou entre 37% (controle) e 70% (2,33 μM de KIN) aproximadamente nos tratamentos com maiores médias de resposta na presença de CA. A eficiência do CA na adsorção de compostos fenólicos já foi amplamente verificada na micropropagação de espécies frutíferas (AHMAD et al., 2013). Entretanto, segundo Druart e Wulf (1993), o uso do CA pode acidificar o meio de cultura quando autoclavado juntamente com a sacarose, podendo diminuir a capacidade de absorção dos explantes. Além disso, de acordo com Nicoloso et al. (2001), o CA reduz a disponibilidade de nutrientes no meio de cultura devido a sua alta capacidade adsorptiva. Desta forma, é possível que tais efeitos possam ter causado os resultados inferiores obtidos em todas as variáveis quando comparados com sua ausência. Ainda que a concentração de CA utilizada nesse ensaio (1 g.L^{-1}) é baixa comparada a utilizada em outros estudos de micropropagação de lenhosas (SANTOS et al., 2006; VILLA et al., 2006).

A taxa de multiplicação de brotos calculada após 60 dias variou entre 0,99 (6,97 μM de KIN) e 1,46 (controle) na ausência de CA, nas maiores médias; nenhum tratamento apresentou maior multiplicação de brotos em relação ao tratamento controle. Por outro lado, os tratamentos com 8,88 μM de BAP e 9,30 μM de KIN tiveram efeito negativo na multiplicação de brotos em relação ao tratamento sem citocinina. List et al. (1996) observaram taxa de multiplicação de brotos de 7,23 brotos por nó usando 4,5 μM de BAP e 3,43 brotos por nó usando 4,5 μM de KIN em meio MS para *Melaleuca alternifolia*, maiores que as observadas nos tratamentos semelhantes nesse estudo (1,22 brotos com 4,44 de BAP e 1,40 brotos com 4,65 de KIN). Diferente do que foi observado nesse estudo, Speer (1993), usando 1,0 μM de BAP em seu estudo com 11 espécies de Myrtaceae, conseguiu uma alta taxa de multiplicação para sete delas, entre 6 e mais de 10 brotos por explante. No presente estudo, na presença do CA, as taxas de multiplicação de brotos mais elevadas variaram entre 0,85 (6,66 μM de BAP) e 1,10 (4,44 μM de BAP), valores significativamente maiores que o controle (Tabela 5). Os explantes cultivados em meio sem regulador ou contendo 2,22 de BAP ou 4,65 μM de KIN apresentaram menores médias de multiplicação de brotos comparando com os mesmos tratamentos sem CA.

A quantidade de novas gemas produzidas não aumentou na presença de citocininas nos tratamentos sem CA em relação ao controle. No entanto, os

tratamentos com 8,88 μM de BAP e 9,30 μM de KIN tiveram efeito negativo na formação de novas gemas em relação aos outros. Em relação a essa variável, a presença do CA não foi positiva em nenhuma concentração de citocinina; pelo contrário, nos tratamentos controle, 2,22 μM de BAP ou 4,65 de KIN na presença do CA, a multiplicação de gemas foi reduzida em relação aos mesmos tratamentos sem CA.

TABELA 5 – EFEITO DE 6-BENZILAMINOPURINA, CINETINA E CARVÃO ATIVADO NA MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES EM SEGMENTOS NODAIS DE *Plinia cauliflora* VAR. SABARÁ APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO WPM.

CITOCININA (μM)	SEGMENTOS RESPONSIVOS (%)		MULTIPLICAÇÃO DE BROTO*		MULTIPLICAÇÃO GEMAS*		TAMANHO MÉDIO DOS BROTOS (cm)	
	SCA	CA	SCA	CA	SCA	CA	SCA	CA
Controle	91,6 aA $\pm 6,1$	37,5 aB $\pm 35,9$	1,43 aA $\pm 0,18$	0,54 bB $\pm 0,53$	2,36 aA $\pm 0,27$	0,96 bB $\pm 0,97$	4,41 aA $\pm 0,48$	1,78 bB $\pm 1,74$
BAP 2,22	45,8 aA $\pm 13,4$	0,0 bB $\pm 0,00$	1,46 aA $\pm 0,21$	0,00 bB $\pm 0,00$	1,54 aA $\pm 0,29$	0,00 bB $\pm 0,00$	3,25 aA $\pm 0,43$	0,00 bB $\pm 0,00$
BAP 4,44	35,4 a $\pm 9,6$	62,5 a $\pm 19,2$	1,22 a $\pm 0,17$	1,10 a $\pm 0,33$	1,44 a $\pm 0,34$	2,18 a $\pm 0,70$	3,08 a $\pm 0,54$	3,65 a $\pm 1,35$
BAP 6,66	45,8 a $\pm 20,2$	47,9 a $\pm 24,2$	1,04 a $\pm 0,33$	0,85 a $\pm 0,39$	1,23 a $\pm 0,47$	1,73 a $\pm 0,78$	2,89 a $\pm 0,90$	2,86 a $\pm 1,33$
BAP 8,88	16,6 b $\pm 21,3$	50,0 a $\pm 37,0$	0,25 b $\pm 0,32$	0,60 b $\pm 0,47$	0,38 b $\pm 0,48$	1,21 a $\pm 0,92$	0,94 b $\pm 1,22$	2,47 a $\pm 1,42$
KIN 2,33	81,2 a $\pm 23,4$	70,8 a $\pm 31,3$	1,38 a $\pm 0,43$	0,93 a $\pm 0,40$	2,25 a $\pm 0,73$	1,83 a $\pm 0,87$	4,65 aA $\pm 0,65$	2,04 aB $\pm 0,89$
KIN 4,65	91,6 aA $\pm 12,3$	16,6 bB $\pm 21,3$	1,40 aA $\pm 0,22$	0,31 bB $\pm 0,40$	2,27 aA $\pm 0,48$	0,50 bB $\pm 0,67$	3,76 aA $\pm 0,36$	0,68 bB $\pm 0,87$
KIN 6,97	66,6 a $\pm 29,6$	43,7 a $\pm 27,5$	0,99 a $\pm 0,43$	1,00 a $\pm 0,44$	1,85 a $\pm 0,83$	1,29 a $\pm 0,60$	3,67 a $\pm 1,74$	3,19 a $\pm 1,52$
KIN 9,30	29,1 b $\pm 29,4$	47,9 a $\pm 35,7$	0,48 b $\pm 0,47$	0,67 b $\pm 0,51$	0,92 b $\pm 0,89$	1,30 a $\pm 0,97$	1,81 b $\pm 1,74$	1,90 a $\pm 1,42$

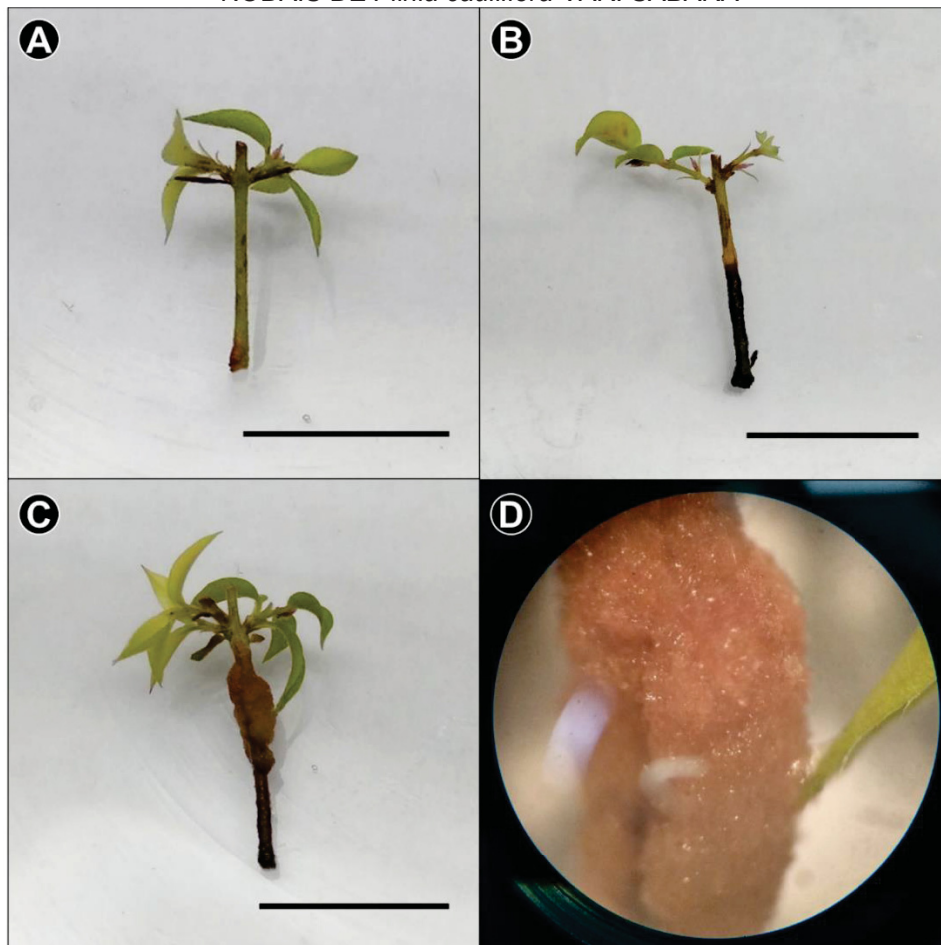
FONTE: o autor (2019).

NOTA: SCA: sem carvão ativado. CA: com carvão ativado. *Taxa de multiplicação de brotos e gemas. Segmentos responsivos: porcentagem de segmentos que desenvolveram brotos. Comparação de médias feita pelo teste de Scott-Knott (5%). Dados seguidos de letras minúsculas iguais dentro das colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si. Quando as letras são ausentes, a diferença não foi significativa.

O tamanho médio dos brotos também não foi afetado de forma positiva pela presença das citocininas ou CA (Tabela 5). O tamanho variou entre 2,89 cm (6,66 μM de BAP) e 4,65 cm (2,33 μM de KIN) nas maiores médias na ausência de CA. Em contrapartida, os tratamentos com 8,88 μM de BAP e 9,30 μM de KIN tiveram efeito negativo sobre o tamanho dos brotos. A presença do CA causou redução no tamanho dos brotos nos tratamentos controle, com 2,22 μM de BAP, 2,33 μM e 4,65 μM de KIN.

O crescimento de bactérias endofíticas ao redor dos explantes foi observado em todos os tratamentos durante todo o experimento. Após 60 dias do início do experimento, os explantes mantidos na presença de citocinina iniciaram o desenvolvimento de calo no caule, sobretudo nos tratamentos com 8,88 μM de BAP (14,28% dos explantes) e 9,30 μM de KIN (9,67%), na ausência de CA (Figura 3C e D). A formação dos calos no caule de segmentos nodais submetidos a concentrações de 1,11 a 8,8 μM de BAP também foi observada na multiplicação da gabirobeira (*Campomanesia adamantium*) (ROSSATO et al., 2015); segundo os autores, uma alta concentração endógena de auxinas juntamente com o BAP pode levar a formação de calos. Os outros tratamentos apresentaram menos de 6% de explantes formando calo, com exceção do controle, onde não foi verificada a calogênese. Além disso, após esse período, também foi observado oxidação e necrose na base de alguns explantes em todos os tratamentos, inclusive no controle, com ou sem CA (Figura 3B).

FIGURA 3 – ASPECTOS GERAIS DA MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS AXILARES EM SEGMENTOS NODAIS DE *Plinia cauliflora* VAR. SABARÁ



FONTE: o autor (2019).

NOTA: A: segmento nodal e brotos alongados de gemas axilares aos 30 dias; B: segmento nodal

com base oxidada aos 60 dias; C: segmento nodal com formação de calo aos 60 dias; D: calo da imagem C aumentado 10x no microscópio estereoscópico de luz. Barra: 1 cm.

4 CONCLUSÕES

Foi obtido um protocolo eficiente de germinação *in vitro* que possibilitou a obtenção de explantes jovens para serem utilizados na micropropagação das jabuticabeiras. Recomenda-se o uso do meio WPM adicionado de 3 g.L⁻¹ de CA e 1 ml.L⁻¹ de PPM™. O uso do CA no meio de cultura foi benéfico para a germinação e desenvolvimento das plântulas. A exsudação de compostos fenólicos pelas sementes parece prejudicar o processo de germinação. O PPM™ foi eficiente para conter a contaminação na germinação *in vitro*. Entretanto, a contaminação persistente durante os subcultivos da multiplicação revela a presença de microrganismos endofíticos latentes nas plântulas germinadas *in vitro*.

As espécies de jabuticabeira estudadas nesse trabalho apresentaram desenvolvimento lento durante o processo de multiplicação, mesmo com a utilização de explantes jovens. O uso da citocinina BAP influenciou positivamente a multiplicação das espécies *P. peruviana* e *P. cauliflora* var. *sabará*; a concentração de 4,4 µM foi a mais eficiente, entretanto, a multiplicação dessas jabuticabeiras é baixa e ocorre de forma lenta. O uso do BAP e KIN nas concentrações testadas não teve efeito significativo na multiplicação da espécie *P. cauliflora* var. *sabará*. O CA a 1 g.L⁻¹ apresentou efeito inibitório sobre a multiplicação dessa espécie, não sendo benéfico em relação a nenhuma variável avaliada.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; HUSSAIN, T.; ASHRAF, I.; NAFEES, M.; MARYAM, R. M.; IQBAL, M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013.
- BEKTAŞ, E.; CÜCE, M.; SÖKMEN, A. *In vitro* germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, n. 2, p. 336-342, 2013.
- BRONDANI, G. E.; DE WIT ONDAS, H. W.; BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N.; DE ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012.
- CASSOL, D. A.; WAGNER JUNIOR, A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I. Packaging type, time and indol-butiric acid in the jaboticaba fruit tree [*Plinia cauliflora* (DC.) Kausel] propagation by air layering. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 267-272, 2015.
- CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452010000200001&lng=en&nrm=iso>. Acessado: 20/08/2019.
- DANNER, MA.; CITADIN, I.; SASSO, SAZ.; AMBROSIO, R.; WAGNER JÚNIOR, A. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 246-252. 2011.
- DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: **Micropropagation**. Springer, Dordrecht, p. 1-13. 1991.
- DEMATTE, M. E. R. P. Ornamental use of brazilian Myrtaceae. **Acta Horticulturae**, v. 452. p. 143-179. 1996.
- DRUART, P.; WULF, O. D. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, n. 1, p. 97-99, 1993.
- DUARTE, O.; PAULL, R. E. (2015). **Exotic Fruits and Nuts of the New World**, CAB International, Wallingford, England, p. 342, 2015.
- DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, n. 3, p. 231-235, 1995.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Micropropagation: uses and methods**. In: Plant Propagation by Tissue Culture (pp. 29-64). Springer, Dordrecht. 2008.

- GHORPADE, R. P.; CHOPRA, A.; NIKAM, T. D. *In vitro* zygotic embryo germination and propagation of an endangered *Boswellia serrata* Roxb., a source of boswellic acid. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 16, n. 2, p. 159-165, 2010.
- GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 3, p. 316-321, 2003.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. Plant propagation: principles and practices. **Prentice-Hall**. 2014.
- KHAN, P. S. V.; HAUSMAN, J. F.; RAO, K. R. Clonal Multiplication of *Syzygium alternifolium* (WIGHT) WALP, Through Mature Nodal Segments. **Silvae Genetica**, v. 48, n. 1, p. 45-49, 1999.
- KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.
- LATA, H.; CHANDRA, S.; KHAN, I. A.; ELSOHLY, M. A. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. — an important medicinal plant. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 15, n. 1, p. 79-86, 2009.
- LIST, S. E.; BROWN, P. H.; LOW, C. S.; WALSH, K. B. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 36, n. 6, p. 755-760, 1996.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Woody Plant Medium: A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. **HortScience**, v. 16, p. 453, 1981.
- MAGUIRE, J. D. Speed of Germination — Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor 1. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SANTOS, B. R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1668-1671, 2007.
- MATTOS, J. L. R. **Fruteiras nativas do Brasil: jaboticabeiras**. Porto Alegre: Nobel, p. 92. 1983.
- MICHELI, M.; PELLEGRINO, S.; PICCIONI, E.; STANDARDI, A. Effects of double encapsulation and coating on synthetic seed conversion in M. 26 apple rootstock. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 3, p. 347-356, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NEVES, C. S. V. J. Sementes recalcitrantes: revisão de literatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 1459-1467, 1994.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.

NIEDZ, R. P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **HortTechnology**, v. 8, n. 4, p. 598-601, 1998.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OLIVEIRA, Y.; PINTO, F.; DA SILVA, A. L. L.; GUEDES, I.; BIASI, L. A.; QUOIRIN, M. An efficient protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 46, n. 2, p. 192-197, 2010.

PACEK-BIENIEK, A.; DYDUCH-SIEMIŃSKA, M.; RUDAŚ, M. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). **Folia Horticulturae**, v. 22, n. 2, p. 45-50, 2010.

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

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; DE SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jaboticabeira. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 1, p. 19-23, 2007.

RAI, M.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2009.

ROSSATO, M.; SCHUMACHER, P. V.; COSTA NETTO, A. P.; SOUZA, G.; REIS, E.; STEIN, V. C. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de gabirobeira. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 70-77, 2015.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. D.; SILVA, D. P. C. D.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. D. O. Micropropagation of "pequizeiro" (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 1, p. 23-31, 2010.

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

- SHIN, Y. K.; BAQUE, M. A.; ELGHAMEDI, S.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Effects of Activated Charcoal, Plant Growth Regulators and Ultrasonic Pre-treatments on *in vitro* Germination and Protocorm Formation of *Calanthe* Hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 5, p. 582, 2011.
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F. L. E. Myrtaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acessado: 04 de maio de 2019.
- SOUZA, L. D. S. D.; FIOR, C. S.; SOUZA, P. V. D. D.; SCHWARZ, S. F. Disinfestation of seeds and *in vitro* multiplication of guabijuzeiro from apical segments juveniles (*Myrcianthes pungens* O. Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 691-697, 2011.
- SPEER, S. S. Micropropagation of some Myrtaceae species which show potential as new ornamental plants. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 33, n. 3, p. 385-391, 1993.
- TAFRESHI, S. A. H.; SHARIATI, M.; MOFID, M. R.; NEKUI, M. K. Rapid germination and development of *Taxus baccata* L. by *in vitro* embryo culture and hydroponic growth of seedlings. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 5, p. 561-568, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal 3 ed. **Porto Alegre: Artmed**, v. 719, 2004.
- TEIXEIRA, G.H.A.; DURIGAN, J. F.; SANTOS, L. O.; HOJO, E. T.; CUNHA JÚNIOR, L. C. Changes in the quality of jaboticaba fruit (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg. cv. Sabará) stored under different oxygen concentrations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 15, p. 2844-2849, 2011.
- THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 618-631, 2008.
- TITOV, S.; BHOWMIK, S. K.; MANDAL, A.; ALAM, M. S.; UDDIN, S. N. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv. Kanthali floral bud explants. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 97-104, 2006.
- VALIO, I. F. M.; FERREIRA, Z. L. Germination of seeds of *Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 2, p. 95-98, 1992.
- VILA, R.; SANTANA, AI.; PÉREZ-ROSÉS, R.; VALDERRAMA, A.; CASTELLI, MV.; MENDONÇA, S.; CAÑIGUERAL, S. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of α -bisabolol. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2510-2514. 2010.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; DE ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. S. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 47-53, 2006.

YADAV, U.; LAL, M.; JAISWAL, V. S. *In vitro* micropropagation of the tropical fruit tree *Syzygium cuminii* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 21, n. 1, p. 87-92, 1990.

YOUSSEF, M. A.; EL-HELW, M. R.; TAGHIAN, A. S.; EL-AREF, H. M. Improvement of *Psidium guajava* L. using micropropagation. In: **II International Symposium on Guava and other Myrtaceae**, v. 849. p. 223-230, 2010.

CAPÍTULO 2

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A TECIDOS CULTIVADOS *IN VITRO* E FOLHAS DE *Plinia peruviana*

RESUMO

- Bactérias endofíticas observadas frequentemente no processo de micropropagação da jabuticabeira *Plinia peruviana* ainda não foram estudadas. Microrganismos endofíticos geralmente estão associados à promoção do crescimento vegetal e podem ser úteis durante a micropropagação dessa frutífera.
- Foram isoladas bactérias endofíticas associadas a tecidos de *Plinia peruviana* cultivados *in vitro* e folhas de árvores do campo. As bactérias foram caracterizadas em relação à produção de compostos indólicos com ou sem triptofano; foram testadas quanto ao seu potencial de promoção de crescimento vegetal como inoculantes na germinação de sementes de jabuticabeira *in vitro*; também foi realizado um teste de sensibilidade dos isolados em relação a oito composições de antibióticos.
- Foram obtidos 65 isolados, 11 a partir de segmentos nodais cultivados *in vitro* e 54 de folhas. Todas as bactérias avaliadas produziram compostos indólicos na ausência do triptofano. Aquelas que apresentaram as maiores médias foram identificadas como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Stenotrophomonas* spp. por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S. Efeito positivo foi verificado na taxa e velocidade de germinação no caso das sementes inoculadas com bactérias do gênero *Stenotrophomonas* e *Bacillus*. A estirpe de *Azospirillum brasilense* (Ab-V6) usada como referência, afetou positivamente o tamanho médio das raízes. Entre 16 bactérias avaliadas, uma isolada das folhas foi resistente aos oito antibióticos testados. Amoxicilina, cloranfenicol, estreptomicina e levofloxacina inibiram o crescimento dos isolados obtidos das culturas *in vitro*.
- Esse trabalho traz o primeiro relato sobre microrganismos endofíticos associados a uma espécie de jabuticabeira, os quais revelaram capacidade de promoção de crescimento vegetal.

Palavras-chave: jabuticaba; frutífera; micropropagação; Myrtaceae; PGPB

ABSTRACT

- Endophytic bacteria frequently observed during the micropropagation process of *Plinia peruviana* have not yet been studied. Endophytic microorganisms are generally associated with plant growth promotion and may be useful during the propagation of this fruit tree.
- Endophytic bacteria associated with *in vitro* cultured tissues and field plants of *Plinia peruviana* were isolated. The bacteria were characterized in terms of production of indolic compounds in the presence or not of tryptophan; they were also tested for their potential to promote plant growth as inoculants during jaboticabeira seed germination and finally a sensitivity test to eight antibiotics was performed.
- Sixty-five isolates were obtained, 11 from nodal segments grown *in vitro* and 54 from leaves. All of them produced indolic compounds in the absence of tryptophan. Those with the highest production were identified as *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. and *Stenotrophomonas* spp. by sequencing the 16S rRNA gene. A positive effect on germination rate and speed was verified in the case of seeds inoculated with bacteria of *Stenotrophomonas* and *Bacillus* genera. The *Azospirillum brasilense* (Ab-V6) strain used as a reference positively affected the average root size. Among 16 evaluated bacteria isolates, one leaf isolate was resistant to the eight antibiotics tested. Amoxicillin, chloramphenicol, streptomycin and levofloxacin inhibited the growth of isolates obtained from *in vitro* cultures.
- This paper presents the first report on endophytic microorganisms associated with a species of jaboticaba tree, which revealed their ability to promote plant growth.

Key-words: Myrtaceae; jaboticaba; fruit tree; micropropagation; PGPB

1 INTRODUÇÃO

A jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts) é uma árvore frutífera com distribuição natural no Brasil pertencente à família Myrtaceae (SOBRAL et al., 2015). Seu fruto, a jabuticaba, é o mais popular entre aqueles de espécies nativas do país. É conhecida internacionalmente como “*brazilian grape*” devido a sua polpa adocicada e casca de cor roxa escura. Sua propagação é feita principalmente por sementes, as quais são recalcitrantes e só podem ser armazenadas por um curto período (DANNER et al., 2011). A micropropagação dessa espécie ainda não foi relatada e seria de extrema importância para a produção clonal de matrizes selecionadas. Testes iniciais mostraram que esse processo é muito lento; além disso, o crescimento de bactérias endofíticas no meio de cultura foi recorrente (estudos não publicados) durante a germinação *in vitro* de sementes e micropropagação. No entanto, as funções desempenhadas por essas bactérias não são conhecidas. Uma hipótese é que possam promover o crescimento vegetal. A presença de microrganismos na cultura de tecidos *in vitro* é relatada como um dos maiores problemas, já que estes podem levar à perda dos explantes (CASSELLS, 1991). Por outro lado, estudos atuais estão sendo realizados com o intuito de explorar as potencialidades de endófitos na cultura de tecidos (JIE et al., 2009; QUAMBUSCH et al., 2014; ZHU et al., 2016; ORLIKOWSKA et al., 2017;).

Bactérias endofíticas são caracterizadas como aquelas que vivem no interior dos tecidos vegetais e não causam sintomas visíveis no hospedeiro (HALLMANN et al., 1997). A interação entre essas bactérias e o vegetal é variável. Algumas estão fortemente ligadas ao hospedeiro por meio de um processo de coevolução; outras são consideradas como oportunistas, entram pelas raízes e se estabelecem no caule e folhas (HARDOIM et al., 2008; WANG e DAI, 2011). Muitas são benéficas ao hospedeiro, sendo classificadas como Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (SANTOYO et al., 2016). Entre os benefícios promovidos por elas, destacam-se solubilização do fosfato, fixação de nitrogênio e produção de compostos indólicos (CI) com ação auxínica (REINHOLD-HUREK et al., 2011).

Até o momento havia uma lacuna de conhecimento acerca das bactérias endofíticas associadas a espécies de jabuticabeira, tanto *in situ* como *in vitro*. É provável que essas frutíferas sejam colonizadas por bactérias promotoras de crescimento vegetal, assim como já foi verificado em estudos realizados com outras

espécies de Myrtaceae (FERREIRA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009; PAZ et al., 2012). Portanto, o objetivo desse trabalho foi obter bactérias endofíticas capazes de promover o crescimento vegetal de *Plinia peruviana*. Para isto, bactérias foram isoladas de folhas e de tecidos cultivados *in vitro*, caracterizadas e avaliadas em sementes de *Plinia peruviana*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados segmentos nodais de plântulas cultivadas *in vitro* de *Plinia peruviana* com três meses de idade, sem contaminação aparente, cedidas pelo Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná. As plântulas eram mantidas em meio de cultura com 0,1% de *Plant Preservative Mixture* (PPM™), um biocida comercial de amplo espectro. As folhas utilizadas tinham aparência saudável e foram coletadas de uma árvore localizada em Curitiba (Paraná, Brasil) (25°23'53.4"S 49°19'04.5"W).

2.2 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

O isolamento das bactérias foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Florestas. Segmentos nodais e folhas foram esterilizados superficialmente em capela de fluxo laminar, com a imersão em álcool etílico 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 5% (5 minutos para os segmentos nodais e 10 minutos para as folhas), seguido de seis lavagens em água destilada estéril. Para isolar bactérias das culturas *in vitro*, 1 g de segmentos nodais esterilizados foram macerados com 9 ml de solução salina (0,85%). A partir desta solução, foi realizada uma diluição seriada (fator 10) de 10^{-2} a 10^{-7} . Alíquotas de 100 µl de cada diluição foram inoculadas em triplicata em placas de Petri contendo 30 ml de meio de cultura sólido (15 g.L⁻¹ de ágar imédia) DYGS (RODRIGUEZ NETO et al., 1986). As placas foram incubadas a 28 °C por sete dias para o crescimento das bactérias. O isolamento das bactérias do tecido foliar foi feito com 10 g de folhas trituradas com 90 ml da solução salina citada acima, durante um minuto, em um liquidificador esterilizado. Posteriormente o protocolo seguiu o mesmo procedimento descrito para os segmentos nodais. Foram escolhidas as colônias diferentes em cada diluição onde houve crescimento bacteriano. Os isolados foram então repicados sucessivamente até a obtenção de isolados puros.

As bactérias foram caracterizadas pela morfologia de suas colônias em meio DYGS. Foram avaliados: a manifestação de crescimento a partir do crescimento de três colônias isoladas (muito rápida: 1 dia, rápida: 2 a 3 dias, intermediária: 4 a 5 dias,

lento: 6 a 9 dias, muito lento: superior a 10 dias), o diâmetro (mm), a forma (puntiforme, circular ou irregular), elevação (plana, convexa, côncava, elevada e protuberante), borda (inteira ou irregular), superfície (lisa ou rugosa), produção de muco (escassa, pouco, moderada e abundante) e transparência (opaca, transparente e translúcida).

A similaridade dos isolados foi calculada usando o coeficiente de Jaccard. Por meio do método *unweighted pair group method with arithmetic averages* (UPGMA) foi gerado um dendrograma agrupando os isolados das folhas e culturas in vitro (*software* NTSYS, versão 2.1t). Representantes dos grupos fenotípicos (com 80% de dissimilaridade) foram selecionados para os testes de sensibilidade a antibióticos e produção de compostos indólicos.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

A sensibilidade das bactérias isoladas e do *Azospirillum brasilense* (estirpe Ab-V6, cedida pela Embrapa Soja) a antibióticos foi testada pelo método de difusão em ágar (BAUER et al., 1966) modificado para o estado do inoculo e meio de cultura. Foram usados discos para antibiograma (Laborclin®): amoxicilina, cefotaxima, tetraciclina, cloranfenicol ($30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), estreptomicina, gentamicina ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$), eritromicina ($15 \mu\text{g.ml}^{-1}$) e levofloxacina ($5 \mu\text{g.ml}^{-1}$). As bactérias foram cultivadas em meio sólido por 24h, após o crescimento foram repicadas em placa contendo o meio sólido DYGS. Em cada placa foram inseridos quatro discos de antibióticos distintos. O teste foi realizado em duplicata, a incubação ocorreu por 24h a 28°C e então o diâmetro do halo de inibição de crescimento foi medido com auxílio de um paquímetro digital (mm).

2.4 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS

Para avaliar a produção de compostos indólicos, as bactérias isoladas foram cultivadas em meio líquido por 24h, até atingirem uma densidade óptica ($\text{DO}_{630\text{nm}}$) entre 0,6 e 0,8. Como controle foi utilizada a estirpe Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* que é amplamente utilizada em inoculantes comerciais para gramíneas e legumes no Brasil (HUNGRIA et al., 2018). Alíquotas de 500 μl de cada solução foram inoculadas em triplicata em tubos de ensaio com 5 ml de meio líquido (suplementado com 100mg.l^{-1} de L-triptofano ou não) e mantidas por 48h em incubadora no escuro, a

28 °C sob agitação de 150 rpm. As soluções foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, 2 mL do sobrenadante foram misturados a 1 ml do reagente de Salkowski (SARWAR e KREMER, 1995) e mantidos no escuro por 30 minutos para coloração. A leitura da DO_{535nm} foi feita em espectrofotômetro e a quantificação de compostos indólicos produzidos foi estimada com base em curva padrão de ácido indolacético (Sigma-Aldrich) com intervalo de 0 a 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Os cinco isolados que apresentaram maior produção de compostos indólicos foram selecionados para o teste de germinação de sementes inoculadas com bactérias. Os dados foram analisados no ambiente R versão 3.6.0. Para atingir as premissas da ANOVA, os dados foram transformados para $(x+1)^{0.5}$. A análise de variância e o teste de comparação de médias Tukey foram empregados a um nível de 5% de significância.

2.5 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE JABUTICABEIRA INOCULADAS COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE *Plinia peruviana*

Cinco isolados dos tecidos de *Plinia peruviana* (M4 e M7, isolados das culturas in vitro e F6, F31 e F45 das folhas) foram testados separadamente como inoculantes de sementes de jabuticabeira. Além desses, também foi testada a estirpe Ab-V6 e um tratamento controle não inoculado. As sementes foram retiradas de frutos maduros adquiridos no mercado e desinfestadas com o mesmo protocolo usado para as folhas. As bactérias foram cultivadas em meio líquido sob agitação constante durante 24h e a concentração celular foi ajustada para aproximadamente 10^7 células bacterianas ml^{-1} . Para a inoculação, as sementes foram colocadas em sacos plásticos (separadas por tratamento) onde alíquotas de 300 μl de solução bacteriana foram adicionadas. O saco foi fechado, mantendo certo volume de ar no seu interior, e sacudido vigorosamente para homogeneização. As sementes inoculadas foram colocadas em caixas *Gerbox* previamente esterilizadas, sobre papel *germitest* autoclavado e mantido úmido durante todo o teste. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e, em cada tratamento, foram estabelecidas cinco repetições de 15 sementes. Após 30 dias, foi avaliada a porcentagem de germinação (considerou-se germinadas as sementes que emitiram a radícula), o índice de velocidade de germinação (IVG) conforme Maguire (1962), a porcentagem de sementes germinadas que emitiram a parte aérea, o número médio de raízes emitidas por semente (sementes de jabuticabeira apresentam poliembrião) e o tamanho médio das raízes

(cm). A ANOVA e o teste de comparação de média Scott-Knott foram empregados a um nível de 5% de significância.

2.6 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

Quatro isolados foram selecionados entre os maiores produtores de compostos indólicos na ausência de triptofano (M4, M7, F6 e F31) e cultivados em meio sólido em placas de Petri por 24h. O DNA foi extraído de colônias isoladas com o kit de extração Norgen Biotek Corp., conforme instruções do fabricante. Para amplificação e sequenciamento foram utilizados os iniciadores 27F e 1492R. Uma alíquota de 2,5 µl do DNA extraído foi utilizada na reação de PCR, para um volume final de 50 µl por reação. As concentrações dos reagentes, por reação, foram de 0,2 µM de cada iniciador 27F e 1492R; 2,5 µM de cloreto de magnésio; tampão de PCR 1X; 0,2 µM de cada dNTP e 0,02 U de Taq DNA polimerase. As condições para a amplificação foram: desnaturação inicial a 94° C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 40 s), anelamento (55 °C por 40 s), extensão (72 °C por 1,5 min) e uma extensão final (72 °C por 7 min). Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1%, adicionado de 3 µl de brometo de etídio e visualizados em luz UV. O sequenciamento foi realizado pela MacroGen Inc. (Coréia). As sequencias foram cortadas e o contig formado através do programa ChromasPro versão 2.1.8. As sequencias foram comparadas às do banco de dados do GenBank utilizando o BLAST (BORATYN et al., 2013). O alinhamento foi feito utilizando o ClustalW (TAMURA et al., 2007). A árvore filogenética foi construída usando o método "Neighbor-Joining" e o modelo de 2 parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980) através do *software* MEGA 10.0.5., executando 1000 repetições. As sequências do gene 16S rRNA foram depositadas no GenBank com números de acesso MN315373-MN315376.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Foram isolados 65 microrganismos endofíticos, 11 a partir das culturas *in vitro* e 54 das folhas. A ausência de sintomas de contaminação nas culturas *in vitro*, das quais os brotos foram retirados, demonstra que bactérias endofíticas estavam presentes de forma latente. Fenômeno semelhante foi observado por Abreu-Tarazi et al. (2010), onde bactérias endofíticas foram constatadas após cinco anos de cultivo *in vitro* de abacaxi (*Ananas comosus*), sem que houvesse nesse período qualquer sintoma visível. Isso também foi verificado para culturas de pupunha (*Bactris gasipaes*) consideradas axênicas; por meio de microscopia de luz e eletrônica, bactérias endofíticas foram observadas em células parenquimáticas (ALMEIDA et al. 2009). Shen et al. (2010) detectaram endófitos em plântulas de *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) mantidas *in vitro* sem sintomas de contaminação. Em estudo realizado com *Eucalyptus benthamii* em processo de micropropagação, também sem contaminação aparente, Esposito-Polesi et al. (2015) indicaram que a composição da comunidade endofítica variou entre diferentes explantes (galhos e tronco) e entre os mesmos explantes em diferentes subcultivos.

A menor quantidade de bactérias endofíticas isoladas dos segmentos nodais em relação às folhas provavelmente é consequência dos explantes serem provenientes de germinação *in vitro*, de forma que as plântulas não entraram em contato com a comunidade endofítica ambiente, principalmente do solo. Chi et al. (2005) demonstraram que bactérias que se associam ao hospedeiro pelas raízes, migram e se estabelecem no caule e nas folhas. Além disso, o uso do biocida PPM™ no meio de cultura também pode ter contribuído para a redução da comunidade endofítica dos brotos. A atividade do PPM™ é efetiva nas áreas de maior absorção e transporte da planta, principalmente no xilema. Por outro lado, bactérias endofíticas também se distribuem em espaços intercelulares e em regiões com baixo transporte e absorção, onde seu efeito é reduzido (MIYAZAKI et al., 2010).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Entre as 17 bactérias avaliadas, apenas F45 não foi suscetível a nenhum dos oito antibióticos avaliados (Tabela 1). Em relação aos isolados das culturas *in vitro*, todos foram afetados, em diferentes níveis, pelos antibióticos amoxicilina, cloranfenicol, estreptomina e levofloxacina. A eritromicina foi eficaz contra apenas 35% dos isolados. Por outro lado, o cloranfenicol teve a maior abrangência, afetando o crescimento de 82% deles, seguido pela amoxicilina, gentamicina, levofloxacina e tetraciclina com 70%. Pereira (2003) também mostrou o efeito positivo do cloranfenicol no controle de bactérias isoladas de tecidos micropropagados de *Solanum tuberosum*. Da mesma forma, o controle de bactérias endofíticas de culturas *in vitro* por meio de diferentes antibióticos foi bem sucedido para *Fraxinus excelsior* (DONNARUMMA et al., 2010) e *Musa* spp. (OLIVEIRA e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2016).

TABELA 1 – SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE *Plinia peruviana* A ANTIBIÓTICOS AVALIADA PELO DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) AO REDOR DE DISCOS IMPREGNADOS

ISOLADO	ANTIBIÓTICO ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)							
	AMC (30)	CTX (30)	CLO (30)	ERI (15)	EST (10)	GEN (10)	LVX (5)	TET (30)
Ab-V6	18	14	12	23	-	26	21	24
M4 (<i>Bacillus</i> spp.)	43	32	41	26	18	11	21	34
M7 (<i>Stenotrophomonas</i> spp.)	11	-	13	-	17	9	32	-
M8	18	8	12	9	11	9	7	16
M9	32	25	35	14	8	-	18	17
F1	9	7	11	7	7	11	-	9
F5	9	7	15	13	-	9	10	25
F6 (<i>Pseudomonas</i> spp.)	9	7	-	-	7	12	-	14
F10	8	13	16	-	20	35	43	16
F11	8	17	20	-	8	10	32	18
F13	11	-	8	-	-	7	11	11
F21	8	19	23	-	9	11	-	10
F29	-	-	18	-	-	-	27	9
F31 (<i>Stenotrophomonas</i> spp.)	-	-	18	-	-	-	16	-
F33	-	-	13	-	-	-	22	-
F40	-	-	-	-	-	13	-	-
F45	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: o autor (2019).

NOTA: Ab-V6: *Azospirillum brasilense*. A inicial “M” representa isolados das culturas *in vitro* e “F” das folhas. AMC: amoxicilina; CTX: cefotaxima; CLO: cloranfenicol; ERI: eritromicina;

EST: estreptomina; GEN: gentamicina; LVX: levofloxacina; TET: tetraciclina. Células preenchidas por hífen (-) correspondem a ausência de halo de inibição.

3.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS

Todas as bactérias testadas produziram compostos indólicos com ou sem adição de 100 mg.ml⁻¹ de L-triptofano (Tabela 2). Na ausência, foi verificada diferença significativa de produção entre os isolados, variando entre 1,54 µg.ml⁻¹ (M10) e 27,41 µg.ml⁻¹ (M4); na presença, as diferenças não foram significativas e a produção variou entre 1,25 µg.ml⁻¹ (M7) e 22,01 µg.ml⁻¹ (M8).

O isolado M4 (*Bacillus* spp.) apresentou alta produção de compostos indólicos, quase três vezes maior que *A. brasilense* que é referência entre bactérias classificadas como PGPB devido a sua produção de fitormônios (FIBACH-PALDI et al., 2011). No estudo de Kuss et al. (2007), a produção de auxinas por uma estirpe de *A. brasilense* foi de 5,04 µg.ml⁻¹ na ausência de triptofano, resultado semelhante ao obtido nesse trabalho. Ali et al. (2009) caracterizaram a produção de auxinas entre 16 estirpes de *Bacillus*, entre 1,7 e 22,2 µg.ml⁻¹ sem adição de triptofano, menor que o verificado para M4. *Pseudomonas* spp. (F6) e um isolado não identificado (F45) apresentaram produção maior que 12 µg.ml⁻¹ sem adicionar triptofano.

Entre os isolados das culturas *in vitro*, M4 (*Bacillus* spp) se destacou como maior produtor de compostos indólicos na ausência de triptofano. A presença dessa bactéria nas culturas *in vitro* poderia influenciar o desenvolvimento dos explantes, pois, compostos com ação auxínica podem causar, por exemplo, o enraizamento de segmentos nodais. Desta forma, essas bactérias provavelmente seriam benéficas durante a etapa de enraizamento e aclimatização das mudas.

Os isolados M8, M9, F10 e F33 aumentaram em mais que o dobro a produção de compostos indólicos na presença do triptofano. Provavelmente essas bactérias utilizaram a via dependente do triptofano para a síntese de compostos indólicos. Entretanto, segundo Porto et al. (2017), a produção de compostos indólicos pela via independente é desejável na seleção de bactérias com potencial de promoção de crescimento vegetal, principalmente devido à baixa disponibilidade do triptofano no ambiente.

TABELA 2 – PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE *Plinia peruviana* NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE TRIPTOFANO (100 mg L⁻¹)

ISOLADO	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS (µg.mL ⁻¹)	
	SEM TRIPTOFANO (*)	COM TRIPTOFANO (ns)
Ab-V6	9,35 c	6,77
M4 (<i>Bacillus</i> spp.)	27,41 a	5,91
M7 (<i>Stenotrophomonas</i> spp.)	10,75 c	1,25
M8	6,55 c	22,01
M9	4,48 c	14,62
M10	1,54 c	2,75
F1	8,17 c	5,91
F6 (<i>Pseudomonas</i> spp.)	12,79 b	10,01
F10	3,97 c	12,58
F11	3,18 c	6,56
F13	6,45 c	3,87
F21	5,26 c	4,62
F29	3,51 c	1,57
F31 (<i>Stenotrophomonas</i> spp.)	9,89 c	8,38
F33	3,44 c	9,03
F40	7,63 c	8,71
F45	16,45 b	8,49
CV (%)	28,84	42,71

FONTE: o autor (2019).

NOTA: dados seguidos por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. Ab-V6: *Azospirillum brasiliense*. A inicial “M” representa isolados das culturas *in vitro* e “F” das folhas. (*) Diferença significativa de variâncias a 5% de probabilidade, (ns) diferença não significativa.

3.4 GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO* INOCULADAS COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE *Plinia peruviana*

Foi verificado efeito significativo da inoculação das sementes com bactérias para as variáveis taxa de germinação, velocidade de germinação e tamanho médio das raízes nas sementes inoculadas (Tabela 3). As outras variáveis não diferiram entre si. Nesse trabalho, o tratamento com o isolado M7 (*Stenotrophomonas* spp.) resultou no aumento da velocidade de germinação. Além disso, causou aumento na quantidade de sementes germinadas em mais de 20% em relação ao controle. Há poucos relatos de utilização de bactérias do gênero *Stenotrophomonas* como inoculantes na literatura. Schmidt et al. (2012) verificaram efeitos positivos de *Stenotrophomonas rhizophila* na germinação de sementes de tomate, algodão e pimentão. Para esses autores, tais benefícios ocorreram principalmente devido ao antagonismo de *S. rhizophila* com microrganismos patógenos e deletérios. Vários

estudos com *Stenotrophomonas* spp. relatam sua efetividade quando utilizada para o biocontrole de patógenos (JERMNAK et al., 2013; ELHALAG et al., 2016; RIVAS-GARCIA et al., 2018;). Entretanto, como as sementes foram desinfestadas previamente à inoculação das bactérias, é possível que a melhora nesses aspectos, pelos menos em parte, tenha ocorrido em razão da produção de fitormônios por *Stenotrophomonas* spp., característica já verificada nesse gênero (RYAN et al., 2009).

O tratamento com *Bacillus* spp. (M4) também acelerou a germinação em relação ao controle, entretanto, não alterou a taxa de germinação. Resultados mais expressivos foram observados por Ndeddy Aka e Babalola (2016) com a inoculação de *Bacillus subtilis* em sementes de *Brassica juncea*. Os autores observaram efeito positivo sobre a germinação, o tamanho da raiz e da parte aérea. Mia et al. (2012) também observaram maior crescimento da plântula e raiz de arroz (*Oryza sativa*) na presença de *Bacillus sphaericus*; entretanto, assim como nesse estudo, a taxa de germinação não variou.

A estirpe Ab-V6 de *A. brasilense* causou aumento no tamanho do número de raízes em comparação ao tratamento não inoculado, possivelmente devido à produção de reguladores de crescimento, sobretudo de compostos indólicos. Os benefícios da inoculação de *A. brasilense* com o objetivo de promover o crescimento já foram amplamente verificados (SAIKIA, et al., 2012; SIVASAKTHIVELAN e SARANRAJ, 2013; TRABELSI et al., 2013). Na inoculação de sementes, Cassán et al. (2009) verificaram influência de uma estirpe de *A. brasilense* no aumento da taxa de germinação, na velocidade de germinação, na biomassa e tamanho de parte aérea e raízes de soja e milho.

Os tratamentos com os isolados F6 (*Pseudomonas* spp.), F31 (*Stenotrophomonas* spp.) e F45 não diferiram estatisticamente em nenhuma variável em relação ao controle. Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas pela promoção de crescimento vegetal (SAHU et al., 2018). Resultado semelhante ao observado nesse estudo foi verificado por Gholami et al. (2009). Esses autores constataram que a inoculação de estirpes de *P. fluorensis* e *P. putida* em sementes de milho aumentou em até 18,5% a taxa de germinação.

TABELA 3 – GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE JABUTICABEIRA INOCULADAS COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE *Plinia peruviana*

BACTÉRIA (300 µl)	GERMINAÇÃO (%)	IVG	EP (%)	NMR	TMR (cm)
Controle	74,67 b	0,86 c	50,44	1,60	2,12 b
Ab-V6	85,34 ab	1,06 abc	53,51	1,83	3,28 a
M4 (<i>Bacillus</i> spp.)	85,34 ab	1,21 ab	51,93	1,70	2,59 ab
M7 (<i>Stenotrophomonas</i> spp.)	97,34 a	1,35 a	53,05	1,75	2,67 ab
F6 (<i>Pseudomonas</i> spp.)	96,67 ab	1,04 bc	40,42	1,72	2,02 b
F31 (<i>Stenotrophomonas</i> spp.)	85,34 ab	1,03 bc	39,10	1,94	2,29 ab
F45	94,67 ab	1,10 abc	52,57	1,77	2,39 ab
CV (%)	12,04	13,50	31,85	17,78	23,06

FONTE: o autor (2019).

NOTA: dados seguidos por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. IVG: índice de velocidade de germinação; EP: emissão da parte aérea em semente germinada; NMR: número médio de raízes; TMR: tamanho médio da raiz.

3.5 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

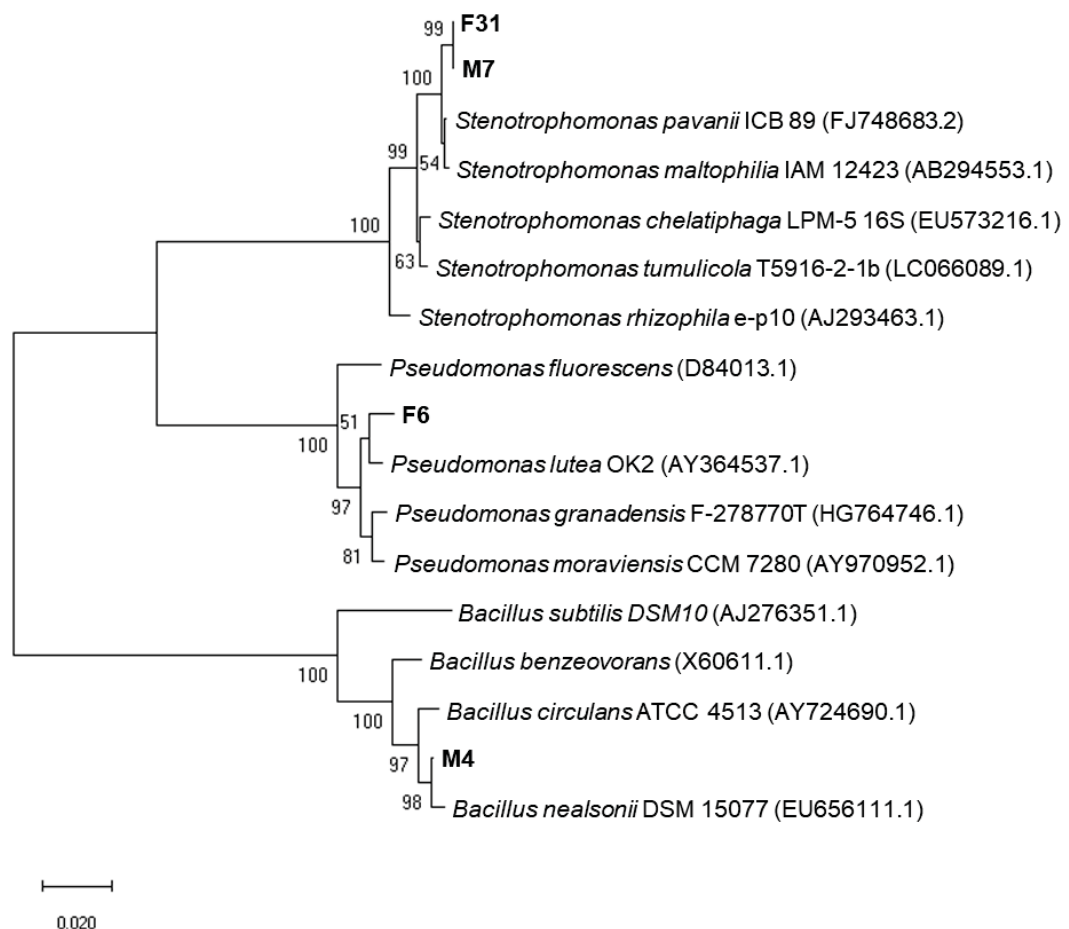
As sequências parciais do gene 16S rRNA de quatro bactérias isoladas indicaram relação com os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* (Figura 1), que possuem espécies classificadas como “bactérias promotoras do crescimento vegetal”, em inglês “PGPB” (JEONG et al., 2010; GLICK, 2012).

O isolado M4 está próximo a *Bacillus nealsonii*, espécie capaz de produzir esporos resistentes a luz ultravioleta (UV), radiação γ , baixa umidade e altas temperaturas (VENKATESWARAN et al., 2003; ZAMMUTO et al., 2018). Segundo Ali et al. (2009), o uso de *Bacillus* spp. na agricultura apresenta vantagens em relação a outras PGPB devido à longa viabilidade dos esporos. Thomas et al. (2019) também verificaram a presença de *Bacillus* spp. em culturas *in vitro* de mamão (*Carica papaya*). Bactérias desse gênero são frequentemente utilizadas em inoculantes comerciais. Associadas ao hospedeiro, atuam no controle biológico de patógenos produzindo antibióticos e também estão relacionadas à solubilização do fosfato (SANSINENEA e ORTIZ, 2011; YASIN et al., 2016).

A bactéria F6 ficou relacionada a *Pseudomonas lutea*. Kwak et al. (2016) demonstraram a capacidade de *P. lutea* de solubilizar fosfato e a presença de genes relacionados a produção de auxinas no seu genoma. A produção de pigmento amarelo de *P. lutea* também foi observada para o isolado F6. Não foram encontrados relatos de *P. lutea* associada a folhas. *Pseudomonas* é um dos mais complexos e numerosos gêneros de bactérias (GOMILA et al., 2015). Segundo Santoyo et al. (2016), representantes desse gênero estão entre as bactérias endofíticas mais comuns associadas a rizosfera.

Os isolados M7 e F31 se agruparam próximos a *Stenotrophomonas pavanii* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Bactérias do gênero *Stenotrophomonas* são encontradas no solo e principalmente associadas a plantas. De acordo com Ryan et al. (2009), apresentam potencial para uso na agricultura devido a capacidade de síntese de compostos indólicos, fixação de nitrogênio e produção de antibióticos. Vários estudos relatam o isolamento de estirpes endofíticas de *S. maltophilia* a partir de raízes (ZHU et al., 2012; ISLAM et al., 2016; ROJAS-SOLÍS et al., 2018). Entretanto, assim como verificado nesse estudo, também estão presentes no caule e nas folhas (BALDAN et al., 2014). *S. maltophilia* é capaz de infectar humanos, podendo ser fatal, principalmente em indivíduos vulneráveis imunologicamente (CHUNG et al., 2017). *S. pavanii* foi descrita recentemente a partir de caule de cana de açúcar e demonstrou capacidade de fixação de nitrogênio (RAMOS et al., 2011).

FIGURA 1 – ARVORE FILOGENÉTICA BASEADA EM SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA RELACIONANDO BACTÉRIAS ISOLADAS DE *Plinia peruviana* E ESTIRPES DE REFERÊNCIAS



FONTE: o autor (2019).

NOTA: isolados mostrados em negritos, valores de Bootstrap maiores que 50% indicados nos nós.
Escala: 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos.

4 CONCLUSÕES

Este trabalho constitui o primeiro relato sobre a comunidade endofítica associada a uma espécie de jabuticabeira. Todos os isolados avaliados têm a capacidade de síntese de compostos indólicos. Além do mais, não necessitam da presença do triptofano. Nesse sentido, o isolado M4 (*Bacillus* spp.) mostrou alta capacidade de produção desses compostos.

Bactérias endofíticas utilizadas como inoculantes tiveram efeitos positivos em diferentes aspectos da germinação de sementes de jabuticabeira. Sementes inoculadas com o isolado M7 (*Stenotrophomonas* spp.) germinaram mais rapidamente e em maior quantidade que as sementes não inoculadas. Essa bactéria poderia ser testada na inoculação de sementes para outras espécies.

Antibióticos eficientes foram selecionados para o controle de bactérias endofíticas associadas a *Plinia peruviana*, à exceção de um isolado. A realização da triagem quanto ao tipo de antibiótico é necessária devido à grande diversidade da comunidade endofítica presente na jabuticabeira.

Com base nesses resultados, a inoculação de explantes com essas bactérias durante o processo de micropropagação de *Plinia peruviana* poderia melhorar algumas etapas, principalmente o enraizamento.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Tarazi M. F., Navarrete A. A., Andreote F. D., Almeida C. V., Tsai S. M., Almeida M. (2010) Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **26**, 555-560.
- Ali B., Sabri A. N., Ljung K., Hasnain S. (2009) Quantification of indolic-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**, 519.
- Araújo W. L., Maccheroni W., Azevedo J. L. (2009) Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. *Genetics and Molecular Research*, **8**, 1408-1422.
- Baldan E., Nigris S., Populin F., Zottini M., Squartini A., Baldan B. (2014). Identification of culturable bacterial endophyte community isolated from tissues of *Vitis vinifera* “Glera”. *Plant Biosystems*, **148**, 508-516.
- Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**, 493-496.
- Boratyn G. M., Camacho C., Cooper P. S., Coulouris G., Fong A., Ma N., Madden T. L., Matten W. T., McGinnis S. D., Merezuk Y., Raytselis Y., Sayers E. W., Tao T., Ye J., Zaretskaya I., Raytselis Y. (2013) BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, **41**, W29-W33.
- Cassán F., Perrig D., Sgroy V., Masciarelli O., Penna C., Luna V. (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, **45**, 28-35.
- Cassells A.C. (1990) Problems in tissue culture: culture contamination. In: Debergh P.C., Zimmerman R.H. (Eds), *Micropropagation Technology and Application*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands. 31–44.
- Chi F., Shen S. H., Cheng H. P., Jing Y. X., Yanni Y. G., Dazzo F. B. (2005) Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7271-7278.
- Chung H., Lieberman T. D., Vargas S. O., Flett K. B., McAdam A. J., Priebe G. P. Kishony R. (2017) Global and local selection acting on the pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* in the human lung. *Nature communications*, **8**, 14078.
- Danner M. A., Citadin I., Sasso S. A., Ambrosio R., Wagner Júnior A. (2011) Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jabuticabeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **33**, 246-252.

- Donnarumma F., Capuana M., Vettori C., Petrini G., Giannini R., Indorato C., Mastromei G. (2010) Isolation and characterization of bacterial colonies from seeds and *in vitro* cultures of *Fraxinus* spp. from Italian sites. *Plant Biology*, **13**, 169-176.
- Elhalag K. M., Messiha N. A. S., Emara H. M., Abdallah S. A. (2016) Evaluation of antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* against *Ralstonia solanacearum* under different application conditions. *Journal of Applied Microbiology*, **120**, 1629-1645.
- Esposito-Polesi N. P., de Andrade P. A. M., de Almeida C. V., Andreote F. D., de Almeida M. (2015) Endophytic bacterial communities associated with two explant sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31**, 1737-1746.
- Ferreira A., Quecine M. C., Lacava P. T., Oda S., Azevedo J. L., Araújo W. L. (2008) Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS microbiology letters*, **287**, 8-14.
- Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, **326**, 99-108.
- Gholami A., Shahsavani S., Nezarat S. (2009) The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, **3**, 35-40.
- Glick B. R. (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, **2012**, 1-15.
- Gomila M., Peña A., Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E. (2015) Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 214.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Klopper J. W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 895-914.
- Hardoim P. R., van Overbeek L. S., van Elsas J. D. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, **16**, 463-471.
- Hungria M., Ribeiro R. A., Nogueira M. A. (2018) Draft genome sequences of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6, commercially used in inoculants for grasses and legumes in Brazil. *Genome Announcements*, **6**, e00393-18.
- Islam S., Akanda A. M., Prova A., Islam M. T., Hossain M. M. (2016) Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1360.

Jeong J. H., Lee O. M., Jeon Y. D., Kim J. D., Lee N. R., Lee C. Y., Son H. J. (2010) Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth-promoting activity. *Process Biochemistry*, **45**, 1738-1745.

Jermnak U., Chinaphuti A., Poapolathep A., Kawai R., Nagasawa H., Sakuda S. (2013) Prevention of aflatoxin contamination by a soil bacterium of *Stenotrophomonas* sp. that produces aflatoxin production inhibitors. *Microbiology*, **159**, 902-912.

Jie L., Zifeng W., Lixiang C., Hongming T., Patrik I., Zide J., Shining Z. (2009) Artificial inoculation of banana tissue culture plantlets with indigenous endophytes originally derived from native banana plants. *Biological Control*, **51**, 427-434.

Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.

Kuss A. V., Kuss V. V., Lovato T., Flôres M. L. (2007) Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **42**, 1459-1465.

Kwak Y., Park G. S., Shin J. H. (2016) High quality draft genome sequence of the type strain of *Pseudomonas lutea* OK2^T, a phosphate-solubilizing rhizospheric bacterium. *Standards in Genomic Sciences*, **11**, 51.

Maguire J. D. (1962) Speed of germination – Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, **2**, 176-177.

Mia M. B., Shamsuddin Z. H., Mahmood M. (2012) Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. *African Journal of Biotechnology*, **11**, 3758-3765.

Miyazaki J., Tan B. H., Errington S. G. (2010) Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPMTM). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **102**, 365-372.

Ndeddy Aka R. J., Babalola O. O. (2016) Effect of bacterial inoculation of strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *Brassica juncea*. *International Journal of Phytoremediation*, **18**, 200-209.

Oliveira J. P. D., Scherwinski-Pereira J. E. (2016) Biochemical characterization of systemic bacteria in bananas, sensitivity to antibiotics and plant phytotoxicity during shoot proliferation. *Acta Scientiarum Agronomy*, **38**, 193-200.

Orlikowska T., Nowak K., Reed B. (2017) Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **128**, 487-508.

Paz I. C. P., Santin R. C. M., Guimarães A. M., Rosa O. P. P., Dias A. C. F., Quecine M. C., Azevedo J. L., Matsumura A. T. S. (2012) *Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. *Genetics and Molecular Research*, **11**, 3711-3720.

Pereira J. E. S., Mattos M. L. T., Fortes G. D. L. (2003) Identification and antibiotic control of endophytic bacteria contaminants in micropropagated potato explants. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **38**, 827-834.

Porto D. S., Farias E. D. N. C., Chaves J. D. S., Souza B. F., Medeiros R. D. D., Zilli J. É., Silva K. D. (2017) Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium ingae* in promoting growth of *Inga edulis* Mart. seedlings. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, **41**, e0160222.

Quambusch M., Pirttilä A. M., Tejesvi M. V., Winkelmann T., Bartsch M. (2014) Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. *Tree Physiology*, **34**, 524-533.

Ramos P. L., Van Trappen S., Thompson F. L., Rocha R. C., Barbosa H. R., De Vos P., Moreira-Filho C. A. (2011) Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**, 926-931.

Reinhold-Hurek B., Hurek T. (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**, 435-443.

Rivas-Garcia T., Murillo-Amador B., Nieto-Garibay A., Chiquito-Contreras R., Rincon-Enriquez G., Hernandez-Montiel L. (2018) Effect of Ulvan on the Biocontrol Activity of *Debaryomyces hansenii* and *Stenotrophomonas rhizophila* against Fruit Rot of *Cucumis melo* L. *Agronomy*, **8**, 273.

Rodrigues Neto J., Malavolta Júnior V.A., Victor O. (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathologica*, **12**, 16.

Rojas-Solís D., Zetter-Salmón E., Contreras-Pérez M., Rocha-Granados M. C., Macías-Rodríguez L., Santoyo G. (2018) *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **13**, 46-52.

Ryan R. P., Monchy S., Cardinale M., Taghavi S., Crossman L., Avison M. B., Berg G., Lelie D., Dow J. M. (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, **7**, 514-25.

Sahu B., Singh J., Shankar G., Pradhan A. (2018) *Pseudomonas fluorescens* PGPR bacteria as well as biocontrol agent: A review. *International Journal of Chemical Studies*, **6**, 01-07.

- Saikia S. P., Bora D., Goswami A., Mudoi K. D., Gogoi A. (2012) A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. *African Journal of Microbiology Research*, **6**, 1085-1102.
- Sansinenea E., Ortiz A. (2011) Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, **33**, 1523-1538.
- Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., Orozco-Mosqueda M. C., Glick B. R. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, **183**, 92-99.
- Sarwar M., Kremer R. J. (1995). Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, **20**, 282-285.
- Schmidt C. S., Alavi M., Cardinale M., Müller H., Berg G. (2012) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405^T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, **48**, 947-960.
- Shen H., Li Z., Han D., Yang F., Huang Q., Ran L. (2010) Detection of indigenous endophytic bacteria in *Eucalyptus urophylla* *in vitro* conditions. *Frontiers of Agriculture in China*, **4**, 37-41.
- Sivasakthivelan P., Saranraj P. (2013) *Azospirillum* and its formulations: a review. *International Journal of Microbiological Research*, **4**, 275-287.
- Sobral M., Proença C., Souza M., Mazine F., Lucas E. (2015) Myrtaceae In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>> (acessado 20 maio 2019)
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Thomas P., Agrawal M., Bharathkumar C. B. (2019) Diverse cellular colonizing endophytic bacteria in field shoots and *in vitro* cultured papaya with physiological and functional implications. *Physiologia Plantarum*, **166**, 729-747.
- Trabelsi D., Mhamdi R. (2013) Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *BioMed Research International*, **2013**, 11.
- Venkateswaran K., Kempf M., Chen F., Satomi M., Nicholson W., Kern R. (2003) *Bacillus nealsonii* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly facility, whose spores are γ -radiation resistant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 165-172.
- Wang Y., Dai C. C. (2011) Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology*, **61**, 207-215.
- Wang Y., He T., Shen Z., Wu, C. (2018) Antimicrobial resistance in *Stenotrophomonas* spp. *Microbiology Spectrum*, **2018**, 1-6.

Yasin M., Munir I., Faisal M. (2016) Can *Bacillus* spp. enhance K⁺ uptake in crop species. In: Meena V., Maurya B., Verma J., Meena R. (eds) Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Springer, New Delhi: 163-170.

Zammuto V., Fuchs F. M., Fiebrandt M., Stapelmann K., Ulrich N. J., Maugeri T. L., Pukall R., Gugliandolo C., Moeller R. (2018) Comparing spore resistance of *Bacillus* strains isolated from hydrothermal vents and spacecraft assembly facilities to environmental stressors and decontamination treatments. *Astrobiology*, **18**, 1425-1434.

Zhu B., Liu H., Tian W. X., Fan X. Y., Li B., Zhou X. P., Jin G.L., Xie G. L. (2012) Genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* RR-10, isolated as an endophyte from rice root. *Journal of Bacteriology*, **194**, 1280-1281.

Zhu B., Liu J. J., Si J. P., Qin L. P., Han T., Zhao L., Wu L. S. (2016) Effects of endophytic fungi from *Dendrobium officinale* on host growth and components metabolism of tissue culture seedlings. *China Journal of Chinese Materia Medica*, **41**, 1602-1607.

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho constitui o primeiro estudo de micropropagação por multiplicação de gemas axilares para as duas espécies de jabuticabeiras avaliadas. Da mesma forma, apresenta o primeiro protocolo eficiente para germinação *in vitro* de sementes de jabuticabeiras.

A obtenção de plântulas jovens e saudáveis a partir da germinação *in vitro* possibilita a obtenção de uma grande variedade de explantes que podem ser utilizados nas mais diversas técnicas da cultura de tecidos. Além disso, plântulas com alto padrão fitossanitário mantidas *in vitro* permitem a pesquisa durante todo o ano, sendo muito útil para as jabuticabeiras, já que estas possuem sementes que não podem ser armazenadas.

A etapa de multiplicação de brotos necessita ser aprimorada para as três espécies. As jabuticabeiras, assim como outras espécies lenhosas, apresentaram lentidão nessa fase. Assim, outras citocininas, concentrações e combinações desses reguladores precisam ser testadas. Entretanto, os dados obtidos nesse estudo serão de extrema importância para fundamentar trabalhos futuros, já que estudos com essas frutíferas são escassos.

Em relação as bactérias endofíticas, inicialmente, tinha-se como objetivo isolar os microrganismos endofíticos que contaminavam de forma persistente as culturas *in vitro* da jabuticabeira para testar antibióticos capazes de controlá-los. Além disso, por meio de comparação fenotípica, averiguar se as bactérias presentes nos segmentos nodais cultivados *in vitro* também habitavam as folhas da árvore matriz que deu origem aos explantes, e dessa forma, constatar que a contaminação de fato era endofítica. Entretanto, devido ao número notável de bactérias que foram isoladas das culturas *in vitro* e das folhas, levantou-se a possibilidade de que esses endófitos poderiam ser benéficos para a jabuticabeira hospedeira.

Os testes de produção de compostos indólicos e de germinação com inoculantes revelaram o potencial dos endofíticos, tanto das culturas *in vitro* como das folhas de jabuticabeira, em promover o crescimento do hospedeiro. Entretanto, uma caracterização mais completa poderia ser realizada com testes que indiquem se esses endófitos são capazes de produzir outros fitormônios, fixar nitrogênio e solubilizar fosfato inorgânico. Ainda assim, os resultados obtidos nesse estudo podem ser

usados como base para pesquisas mais aprofundadas com o emprego das bactérias endofíticas na propagação vegetativa das jabuticabeiras, tanto *in vitro* como *ex vitro*.

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO DE MACRO E MICRONUTRIENTES DOS MEIOS DE CULTURA MS, MS/2, WPM E WPM/2

SAIS (mg.L ⁻¹)	MS	MS/2	WPM	WPM/2
NH ₄ NO ₃	1650	825	400	200
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556	278
K ₂ SO ₄	-	-	990	495
KNO ₃	1900	950	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220	96	48
KH ₂ PO ₄	170	85	170	85
H ₃ BO ₃	6,2	3,10	6,2	3,1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,12	0,25	0,12
KI	0,83	0,41	-	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,012	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	370	185
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	8,45	22,3	11,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,3	8,6	4,3
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025	0,012	0,25	0,12
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	13,9	27,8	13,9
Na ₂ .EDTA	37,3	18,6	37,3	18,6

NOTA: “/2”: metade da concentração de sais.

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO DE VITAMINAS E COMPOSTOS ORGÂNICOS DOS MEIOS DE CULTURA MS, MS/2, WPM E WPM/2

REAGENTE (mg.L ⁻¹)	MS; MS/2	WPM; WPM/2
Ácido Nicotínico	0,5	0,5
Piridoxina	0,5	0,5
Tiamina-HCl	0,1	1,0
Glicina	2,0	2,0
Mio-inositol	100	100

NOTA: “/2”: metade da concentração de sais.

ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA

O capítulo 2 foi submetido à revista “Plant Biology”, ISSN: 1438-8677 e, conforme a norma interna nº 02/2010 do Programa de Pós-Graduação em Botânica, segue a formatação da revista:

¹ARTIGOS DE PESQUISA

Resumo: o resumo deve ser utilizável como um documento independente e não deve exceder 250 palavras. Para todos os artigos submetidos a partir de 2016, é necessário um resumo estruturado usando quatro pontos para indicar (1) a pesquisa conduzida incluindo sua justificativa, (2) métodos centrais aplicados, (3) resultados-chave e (4) principais conclusões incluindo pontos de discussão. Não deve conter citações de outros documentos.

As seções a seguir cobrem o conteúdo usual: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências, Tabelas, Legendas de figuras, Ilustrações. Em Materiais e Métodos, Resultados e Discussão subtítulos são possíveis. Se um autor escolher combinar as seções Resultados e Discussão, uma seção adicional Conclusões poderá ser adicionada, mas isso deve ser breve.

Tabelas: as tabelas devem ser numeradas em série em algarismos arábicos e cada uma deve conter um breve cabeçalho descritivo. Tabelas reproduzidas de outras publicações devem declarar sua fonte precisa. Somente os sinais que podem ser digitados devem ser usados nas tabelas e legendas. Por favor, forneça as Tabelas em Word e inclua-as no final do manuscrito após as Referências, cada uma em uma página separada. Evite usar tabelas e gráficos para demonstrar os mesmos resultados.

¹*Plant Biology – Author Guidelines*. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14388677/homepage/ForAuthors.html>> acessado em: 10/09/2019.

Referências: a lista de referências deve incluir todas as referências citadas. Um máximo de 100 referências são permitidas. Organize as referências alfabeticamente de acordo com o nome do autor, não em ordem cronológica. O nome dos periódicos contendo os artigos citados deve ser dado na íntegra. Nomes de cidade / cidade e país devem ser fornecidos para não-revistas de diário. Cada referência de artigo deve ser fornecida como no exemplo a seguir:

Alfano J.R., Collmer A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. **Annual Review Phytopathology**, 42, 385–414.

Livros ou outras publicações não-seriais que são citadas nas referências devem ser citadas como segue:

Gage J.D., Tyler P.A. (1991) Deep-sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep-sea Floor. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 504 pp.