

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**REGULADORES DE CRESCIMENTO NA EMERGÊNCIA E
INDUÇÃO DE CALOS DE *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel.**

**Blêndali Peres Cardoso
Bióloga**

**JATAÍ – GOIÁS – BRASIL
Maio de 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**REGULADORES DE CRESCIMENTO NA EMERGÊNCIA E
INDUÇÃO DE CALOS DE *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel.**

Blêndali Peres Cardoso
Orientadora: Prof. Dra. Vanessa Cristina Stein
Coorientadora: Prof. Dra. Alessandra Feijó Marcondes

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL
Maio de 2016

Peres Cardoso, Blêndali

Reguladores de crescimento na emergência e indução de calos de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel. [manuscrito] / Blêndali Peres Cardoso, Vanessa Cristina Stein, Alessandra Feijó Marcondes. - 2016. LXXVII, 77 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Cristina Stein; co-orientadora Dra. Alessandra Feijó Marcondes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Agronomia, Jataí, 2016.

Bibliografia.

Inclui fotografias, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. jabuticaba. 2. antioxidante. 3. calogênese. 4. anatomia de calos. I. Cristina Stein, Vanessa . II. Feijó Marcondes, Alessandra . III. Cristina Stein, Vanessa, orient. IV. Feijó Marcondes, Alessandra, co orient. V. Título.

CDU 631/635

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

Blédali Peres Cardoso

Aos vinte e nove dias do mês de Julho de 2016, a partir das 07:00 horas, no Auditório do Mestrado em Agronomia – Unidade Jacobá, Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, teve lugar a sessão de julgamento da Dissertação de Mestrado de Blédali Peres Cardoso intitulada “Reguladores de crescimento na emergência e indução de calos de *Plinia cauliflora* (MART.) RAUSEL”. A Banca Examinadora foi composta, conforme a Designação n.º 01/2016 do Programa de Pós-Graduação em Agronomia UFG/REJ, pelos seguintes membros: Prof. Dr.ª Vanessa Cristina Stein (Presidente), Prof. Dr.ª Danielle Fabíola Pereira da Silva (Membro interno), Prof. Dr. Diego Ismael Rocha (Membro externo). Os examinadores arguiram na ordem citada, tendo o candidato, respondido satisfatoriamente. Às 10:15 a Banca Examinadora passou ao julgamento em sessão secreta, tendo o candidato obtido o seguinte resultado:

Resultado final: Aprovado () Reprovado ()

Reaberta a Sessão Pública, o Presidente da Banca Examinadora proclamou o resultado e encerrou a sessão, da qual foi lavrada a presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora.



Presidente: Prof. Dr.ª Vanessa Cristina Stein



Membro interno: Prof. Dr.ª Danielle Fabíola Pereira da Silva



Membro externo: Prof. Dr. Diego Ismael Rocha

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Blêndali Peres Cardoso – filha de Sulma Rosa Peres Cardoso e Walvernagues Pereira Cardoso, nascida no município de Jataí, Goiás, em 19 de Junho de 1988. Coursou ensino médio no Colégio Estadual João Roberto Moreira onde egressou no ano de 2005. Em 2009 ingressou na Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí e fez iniciação científica com trabalho intitulado: Micropropagação de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambessedes) concluído em 2012. Em 2014 defendeu seu trabalho de conclusão de curso intitulado: Anatomia ecológica foliar decorrente do estresse hídrico e da disponibilidade de luz: uma breve revisão - obtendo o título de bacharela em Ciências Biológicas. Iniciou o Mestrado no Programa de Pós Graduação em Agronomia da UFG em 2014, na área de Produção Vegetal, trabalhando com cultura de tecidos de plantas, defendendo a dissertação no dia 29/07/2016.

**À minha filha Mariana, ao meu esposo
Francisco e a meu cachorrinho Freddy, vocês são minha família.
DEDICO**

**Aos meus sogros queridos, meu pai, irmã e cunhado
OFEREÇO**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Goiás por ter me fornecido a oportunidade de concluir a pós-graduação.

Aos colegas queridos, Tatiana e Bárbara pelo apoio e suporte necessários para que todos os experimentos pudessem ser concluídos.

As Professoras Dra. Vanessa Cristina Stein e Dra. Alessandra Feijó Marcondes pela orientação e coorientação, mesmo sendo mais difícil à distância, a Vanessa não deixou de me orientar e a Alessandra de se responsabilizar por meu experimento enquanto coordenadora responsável do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da UFG.

Ao laboratório de Bioquímica pelo auxílio, desde o uso de aparelhagem até o fornecimento de materiais técnicos.

A minha filha pela compreensão, mesmo que ainda esteja com quatro anos de idade.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente me ajudaram nessa caminhada longa e difícil.

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO GERAL – REGULADORES DE CRESCIMENTO NA EMERGÊNCIA E INDUÇÃO DE CALOS DE <i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Caracterização Botânica de <i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel).....	18
2.2. Germinação	19
2.3. Cultura de Tecidos de plantas.....	22
2.4. Meio de Cultura.....	23
2.5. Oxidação fenólica	25
2.6. Calogênese.....	25
2.7. Análises anatômicas de calos	27
2.8. OBJETIVO GERAL	28
2.9. REFERÊNCIAS	28
3. EMERGÊNCIA DE SEMENTES DE <i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel PRÉ-TRATADAS COM GIBERELINA.....	37
3.1. INTRODUÇÃO	39
3.2. OBJETIVO	40
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.5. CONCLUSÃO.....	46
3.6. REFERÊNCIAS	47
4. CALOGÊNESE E ANÁLISES ANATÔMICAS EM CALOS DE EXPLANTES FOLIARES DE <i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel	50
4.1. INTRODUÇÃO	52
4.2. OBJETIVO	54
4.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.4. Oxidação de explantes foliares de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) em diferentes concentrações de PVP e carvão ativado.....	54
4.4.1. Indução de Calogênese em folhas de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) com 2,4 – D e BAP	55
4.4.2. Indução de calogênese em folhas de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) com ANA e BAP	55

4.4.3. Análises anatômicas de calos de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel).....	56
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.5.1. Oxidação de explantes foliares de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) em diferentes concentrações de PVP e carvão ativado.....	58
4.5.2. Calogênese em folhas de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) com 2,4- D e BAP	60
4.5.3. Calogênese em folhas de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) com ANA e BAP.....	61
4.5.4. Análises Anatômicas de calos de explantes foliares de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel) 64	
5. CONCLUSÃO.....	73
6. REFERÊNCIAS	74

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 - Giberelinas identificadas em arroz.....	21
Tabela 2 - Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962).....	24
Tabela 3 - Tamanho médio da parte aérea (cm) de jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>), após tratamento pré-germinativo com diferentes concentrações de GA ₃ , aos 30, 45 e 60 dias... 44	44
Tabela 4 – Número médio de folhas de jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>), após tratamento pré-germinativo com diferentes concentrações de GA ₃ , aos 30, 45 e 60 dias	44
Tabela 5 - Tratamentos utilizando balanço hormonal com os reguladores de crescimento 2,4-D e BAP em explantes foliares de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>).....	57
Tabela 6 – Porcentagem de oxidação e formação de calos em explantes foliares de Jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) cultivados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de PVP e carvão ativado aos 30 e 45 dias	58
Tabela 7 - Indução de calos em explantes foliares de jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) com 2,4-D e BAP aos 45 e 60 dias	60
Tabela 8 - Indução de calos em explantes foliares de jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) com ANA e BAP, aos 60 dias	62
Tabela 9 - Oxidação de explantes foliares de jabuticabeira (<i>Plinia cauliflora</i>) inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de ANA e BAP, aos 30 e 60 dias	63

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- Figura 1. Porcentagem de emergência de plântulas em função da concentração de GA₃ aos 30 dias de cultivo de jabuticabeira..... 42
- Figura 2. Porcentagem de emergência de plântulas em função da concentração de GA₃ aos 45 dias de cultivo de jabuticabeira..... 43
- Figura 3. Porcentagem de emergência de plântulas em função da concentração de GA₃ aos 60 dias de cultivo de jabuticabeira..... 43
- Figura 4. Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*). A, B- 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP; aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) e (B) Parênquima paliçádico da folha, sem desdiferenciação de tecidos. (C) células em divisão celular, e (D) grande quantidade de grãos de amido. (E) e células vacuolizadas, desorganizadas e (F) poucos grãos de amido..... 66
- Figura 5. Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) com A, B- 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP; aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) células com parede celular delgada e algumas regiões com divisão celular e na periferia do calo muitos espaços intercelulares, (B) pouco grão de amido. (C) e (D) células com parede celular delgada, divisão celular formando regiões globulares organizadas. (E) e células vacuolizadas, parede celular espessa e espaço intercelulares (F) com acúmulo de grão de amido..... 68
- Figura 6. Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) com A, B- 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP; aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) células internas pequenas, com parede celular delgada em região de intensas divisões celulares e células na periferia do calo com muitos espaços intercelulares e (B) grãos de amido. (C) e (D) pouca desdiferenciação celular e muitos espaços intercelulares (E) e (F) células alongadas com muitos espaços intercelulares e (F) sem acúmulo de grãos de amido..... 69

Figura 7. Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) com A, B- 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP; aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) Células pequenas em organização globular e periferia com células alongada e com espaços intercelulares (B) acúmulo de grãos de amido (C) e (D) pouca desdiferenciação (E) e parênquima paliçádico (F) com grão de amido. 70

Figura 8. Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) com A, B- 8,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 8,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 8,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) desdiferenciação desorganizada das células e (B) grande acúmulo de grão de amido (C) e (D) células com parede espessa e pouca organização celular (D) acúmulo de grão de amido (e) região interna do calo com células pequenas e em divisão células rodeadas por células desorganizadas (F) e sem acúmulo de grãos de amido..... 71

REGULADORES DE CRESCIMENTO NA EMERGÊNCIA E INDUÇÃO DE CALOS DE *Plinia Cauliflora* (Mart.) Kausel

RESUMO - Objetivou-se estudar a germinação de sementes e induzir calos em explantes foliares de jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) para caracterizar o seu desenvolvimento. No primeiro experimento, sementes de jabuticaba foram plantadas em casa de vegetação após 24 horas de imersão em diferentes concentrações de GA₃ (0; 250; 500; 1000 e 2000 mg.L⁻¹). Foram avaliados: porcentagem de emergência, tamanho da parte aérea e número de folhas. O delineamento experimental foi DIC com 5 tratamentos e 24 repetições. No segundo experimento, plantas da casa de vegetação serviram como fonte de explante para testar diferentes concentrações de Polivinilpirrolidona - PVP (0; 0,5; 1,0; ou 2) combinado com C.A. (Carvão ativado) nas concentrações 0; 2 ou 4% e inoculados em meio MS. O delineamento utilizado foi o DIC com arranjo fatorial 4 x 3 e 15 repetições. No terceiro experimento, explantes foliares da casa de vegetação foram inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 0,1; 0,2 mg.L⁻¹) em todas as combinações possíveis. Após 30, 45 e 60 dias foram avaliados a presença ou ausência de calos na base do explante. O delineamento utilizado foi o DIC com arranjo fatorial 4 x 3 e 20 repetições cada tratamento. No quarto experimento, explantes foliares da casa de vegetação foram inoculados em meio MS suplementado com ANA (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) em todas as combinações. Após 30, 45 e 60 dias foram avaliados a presença ou ausência de calos na base do explante. O delineamento utilizado foi o DIC com arranjo fatorial 4 X 3 e 20 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância ou comparados através de modelos ao nível de 5%. Para as análises anatômicas, calos provenientes de 15 tratamentos utilizando 2,4-D e BAP foram fixados em lâminas e visualizados em microscópio fotônico acoplado com câmera. O GA₃ aumentou a porcentagem de emergência em torno de 20% nos tratamentos pré-germinativos de 1000 mg.L⁻¹ e 2000 mg.L⁻¹ do regulador por 24 horas, além disso, o tratamento de 1000 mg.L⁻¹ favoreceu o crescimento da parte aérea e aumentou o número de folhas. Para diminuir a oxidação, é indicado a concentração de 2% de carvão ativo ao meio de cultura, combinado com 2,0 mg.L⁻¹ de PVP. Para obtenção de calos, é indicado o uso de meio MS sem a adição de regulador de crescimento, resultado importante para diminuir os custos na utilização de reguladores e da mesma forma obter calos. No entanto, mais estudos são necessários para a indução de calos em jabuticabeira (*Plinia cauliflora*).

Palavras-chave: jabuticaba, antioxidantes, calogênese, anatomia de calos.

GROWTH REGULATORS IN EMERGENCY AND CALLUS INDUCTION OF *Plinia Cauliflora* (Mart.) Kausel

SUMMARY - The objective was to study the seed germination and induce callus in leaf explants of jaboticabeira (*Plinia cauliflora*) to characterize its development. In the first experiment, jaboticaba seeds were planted in greenhouse after 24 hours immersed in different concentrations of GA₃ (0, 250, 500, 1000 and 2000 mg L⁻¹). Were evaluated: emergency percentage, shoot size and number of leaves. The experimental design was DIC with 5 treatments and 24 repetitions. In the second experiment, the greenhouse plants served as a source of explants to test different concentrations of Polivinilpirrolidona - PVP (0; 0,5; 1,0; 2) combined with C.A. (activated charcoal) at concentrations of 0, 2 or 4% and inoculated in MS medium. The design was DIC with factorial arrangement 4 x 3 and 15 repetitions. In the third experiment, leaf explants of greenhouse were inoculated in MS medium supplemented with 2,4-D (0; 1,0; 2,0; 4,0 mg.L⁻¹) and BAP (0,0; 0,1; 0,2 mg.L⁻¹) in all combinations. After 30, 45 and 60 days were evaluated the presence or absence of callus explant on the base. The design was DIC with factorial arrangement 4 x 3 and 20 repetitions each treatment. In the fourth experiment, leaf explants of greenhouse were inoculated in MS medium supplemented with NAA (0; 1,0; 2,0; 4,0 mg.L⁻¹) and BAP (0,0; 1,0; 2 mg.L⁻¹) in all combinations. After 30, 45 and 60 days were evaluated the presence or absence of callus explant on the base. The design was DIC with factorial arrangement 4 X 3 and 20 repetitions. The data were submitted to analysis of variance and the averages compared by Tukey test at 5% significance level or compared using generalized linear models at 5%. For anatomical analyzes, calluses from 15 treatments using 2,4-D and BAP were fixed on blades and viewed in photonic microscope coupled with camera. GA₃ increased the percentage emergence of around 20% in the pre-germination treatment with 1000 and 2000 mg L⁻¹ of regulator for 24 hours, furthermore, treatment of 1000 mg L⁻¹ favored the shoot growth and increased the number of leaves. To reduce oxidation, it is given concentration of 2% activated charcoal to the medium, combined with 2,0 mg.L⁻¹ of PVP. To obtain callus, using MS medium without the addition of growth regulator is indicated, it's important to reduce the costs on the use of growth regulators and obtain calluses. However, more studies are needed to induce calluses on jaboticabeira (*Plinia cauliflora*).

Keywords: jaboticaba, antioxidant, callus induction, callus anatomy.

1. INTRODUÇÃO GERAL – REGULADORES DE CRESCIMENTO NA EMERGÊNCIA E INDUÇÃO DE CALOS DE *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel

A flora brasileira é rica em frutas silvestres comestíveis, constituindo um patrimônio de grande valor genético e cultural. Dentre as espécies nativas de importância do Brasil, destaca-se a jabuticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel), que é uma árvore frutífera pertencente à família Myrtaceae (ALEXANDRE et al., 2006; DANNER et al., 2006).

A família Myrtaceae é uma das famílias botânicas mais importantes do Brasil, compreendendo cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies, entre árvores e arbustos e distribuindo-se por quase todos os continentes, predominando nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SOUZA; LORENZI, 2012) e constituem um patrimônio genético de grande valor (GOMES et al., 2016).

As espécies da família Myrtaceae são importante fonte de óleos essenciais com atividades biológicas que vão desde bacteriostática, fungistática e anti-inflamatória, utilizadas em cremes, sabonetes e creme dental como agentes antimicrobianos e antifúngicos (LIS-BALCHIN; HARS; DEANS, 2000; KUSKOSKI et al., 2003; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

A jabuticabeira é uma espécie arbórea e de médio porte nativa do Brasil e amplamente distribuída em quase todas as regiões, podendo ser encontrada desde o Estado do Pará até o do Rio Grande do Sul (SILVEIRA et al., 2006).

Suas flores desenvolvem-se nos ramos (cauliflora), são brancas, pequenas, apresentam ovário bicarpelar, ínfero e glabro, o estigma é peltado. As folhas possuem a nervura central levemente impressa na epiderme adaxial e saliente na epiderme abaxial (MANICA, 2000; PEREIRA, 2003). O fruto da jabuticabeira é uma baga, subglobosa, negro quando maduro, liso, com 1,6 a 2,2 cm de diâmetro, contendo de 1 a 4 sementes. A casca é fina e muito frágil; a polpa é doce com leve acidez, de ótimo sabor e de cor branca a translúcida (DONADIO; MÔRO; SERVIDONE, 2002).

O fruto da espécie é muito apreciado, seja para consumo *in natura* ou para a fabricação de geléias, vinhos e licores caseiros (DANNER et al., 2007; BORTOLOTTI et al., 2015). A casca do fruto apresenta altos teores de antocianinas e flavonóides (TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2008),

compostos que apresentam atividades anticancerígenas (KAPADIA et al., 1997; HAGIWARA et al., 2001) e antioxidantes. Devido as características do fruto existe um forte apelo comercial para aumentar o consumo *in natura* e industrial como alimentícia, cosméticos e farmacêutica (WANG et al., 2000; CHAVASCO et al., 2014).

Mesmo diante do potencial comercial dos frutos, a Jabuticabeira não desperta atenção para o cultivo em grande escala porque, um dos fatores seria que a planta, quando multiplicadas por semente, leva de oito a quinze anos para produzi frutos (DANNER et al., 2006), demorando para superar o período juvenil (ANDRADE; MARTINS, 2003).

Além disso, essa espécie apresenta dificuldade de propagação vegetativa, devido principalmente, pela dificuldade de enraizamento (MANICA, 2000) e a propagação por sementes, principal método de produção de mudas (SASSO; CITADIN; DANNER, 2010) gera possibilidade de cruzamento natural, que nem sempre é desejável devido a problemas como a segregação e recombinação genética, modificando as características genotípicas e fenotípicas (ALEXANDRE et al., 2006).

As sementes de algumas espécies da família Myrtaceae apresentam comportamento recalcitrante (MALUF; BILIA; BARBEDO, 2003). Uma das formas de acelerar e uniformizar a germinação das sementes é usando ácido giberélico, pois é um regulador que pode controlar a germinação de diversas formas, incluindo a mobilização de reservas do endosperma, alongamento celular, acelerando o desenvolvimento da radícula e da parte aérea (SALISBURY; ROSS, 1992).

A cultura de tecidos se torna uma ferramenta de grande importância para a propagação dessa frutífera, pois supre a dificuldade de propagação seminífera da espécie, através da adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, produzindo clones em larga escala e pequeno espaço físico, diminuindo a segregação e recombinação de genes que ocorrem na propagação sexual.

Devido à importância das espécies dessa família, tanto para recomposição ambiental quanto para comercialização de produtos, a demanda por sementes ou mudas de espécies florestais nativas vem sendo crescente (GOMES et al., 2016).

Muitas espécies arbóreas nativas que possuem grande potencial de utilização são pouco exploradas em função da carência de informações técnicas sobre sua propagação e cultivo, como é o caso de *Plinia cauliflora*, popularmente conhecida como jabuticabeira, portanto, o objetivo desse trabalho foi fornecer informações acerca da germinação *ex vitro* e propagação *in vitro* da espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Caracterização Botânica de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel)

A família Myrtaceae é dominante no leste do Brasil em termos de número de espécies, indivíduos e área de distribuição total (MORI et al., 1983). Possui cerca de 23 gêneros e 1034 espécies segundo a Flora do Brasil (SOBRAL, 2015). É considerada uma Família bem definida, com duas subfamílias que compreendem 17 tribos e os maiores centros de diversidade para a família estão localizados na América do Sul, Austrália e Ásia Tropical (GOVAERTS et al., 2008). A família é muitas vezes caracterizada por ter casca fibrosa, ovário ínfero, folhas opostas cultivados com óleos essenciais aromáticos em 'manchas glandulares' translúcidas (GOVAERTS et al., 2008).

O gênero *Plinia* compreende cerca de 33 espécies segundo a Flora do Brasil (SOBRAL, 2015). De acordo com Sobral (1985), a mudança de gênero *Myrciaria* para o gênero *Plinia* se deve ao fato de que as espécies de *Myrciaria* que possuem inflorescências caulinares, cálice persistente, bractéolas separadas e sementes de cotilédones separados, são consideradas espécies de *Plinia*, ou seja, jabuticabeiras.

Plinia é composto por árvores ou arbustos; flores 4-meras, reunidas em glomérulos caulinares; brácteas e bractéolas separadas, persistentes ou não; cálice fechado; 4 sépalas, rompendo-se irregularmente na antese ou não; persistentes no fruto; hipanto prolongado acima do ovário, não circunciso na antese; ovário bilocular, com 2 óvulos por lóculos. Frutos globosos, com 2 sementes; testa membranácea; embrião eugenióide (dois cotilédones grandes, carnosos e separados) (ARANTES; MONTEIRO et al., 2002).

As jabuticabeiras são plantas genuinamente brasileiras (SOUSA, 2009). A espécie *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel é composta por arbustos de até 2,5m de altura; ramos cilíndricos com ritidoma liso; pubescentes, esbranquiçados. Folhas com pecíolos de 1-1,2 mm; lâminas 1,4-2,5(3,2) x 0,9-1,4 cm, elípticas a oblongas, glabrescentes ou glabras; 2 nervuras marginais quase paralelas; base obtusa a aguda; Glomérulos caulinares, botões 2-3 mm, obovados, glabros; sépalas 1-1,5 mm, glabras, desiguais, ciliadas; pétalas 3-4 mm, largamente obovadas, glabras, ciliadas. Fruto 1,2-3 cm larg.; globoso, glabro (ARANTES; MONTEIRO et al., 2002).

2.2. Germinação

Nas angiospermas, a semente se desenvolve de um óvulo fecundado (FINCH-SAVAGE, 2012). A maturidade fisiológica das sementes geralmente acontece quando ela atinge o máximo de massa seca, poder germinativo e vigor, desligando-se assim da planta mãe, interrompendo a translocação de fotoassimilados e ocorrendo então alterações fisiológicas que levam a secagem das sementes (POPINIGIS, 1995). Para determinar a maturação das sementes, é necessário conhecimento acerca do seu aspecto externo e coloração dos frutos, bem como os seus aspectos morfo-fisiológicos (FIGLIOLIA, 1995; FOWLER; MARTINS, 2001).

As sementes que possuem capacidade fisiológica de tolerar a dessecação pós-colheita são denominadas ortodoxas. Essas sementes toleram a dessecação a graus de umidade próximos de 2% a 5%, ou mesmo abaixo desses níveis (FONSECA; FREIRE, 2003). Por outro lado, as sementes recalcitrantes são sensíveis à dessecação. Como são altamente intolerantes à perda de água, perdem a viabilidade quando expostas e dessecadas e não podem ser armazenadas por longos períodos (CHIN; ROBERTS, 1980; PAMMENTER; VERTUCCI; BERJAK, 1991; SACANDÉ et al., 2004; BERJAK; PAMMENTER, 2008; LI; PRITCHARD, 2009).

Uma proporção significativa de espécies produz sementes que mostram comportamento recalcitrante (BERJAK; PAMMENTER, 2000). Alguns trabalhos descrevem o mínimo grau de tolerância à dessecação das sementes da família

Myrtaceae (ANDRADE; FERREIRA, 2000; KOHAMA et al., 2006; DELGADO; BARBEDO, 2007; PIROLA et al., 2009; DANNER et al., 2011). Entre as espécies do gênero *Eugenia*, existem diferentes graus de sensibilidade à dessecação das sementes com base no teor de água (BARBEDO; BILIA, 1998). O valor médio de umidade das sementes de *Eugenia pyriformis* após o beneficiamento foi de 51% (GOMES et al., 2016), sendo superior aos 45% utilizados por Scalon et. al., (2009), para classifica-las como recalcitrantes.

Segundo Danner et al., (2011), as sementes da espécie *Plinia cauliflora* conservam-se por apenas 5 dias sob temperatura de $17^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ e perdem totalmente a viabilidade com 10% de teor de água. Já no armazenamento a vácuo, com tampão fosfato, sua viabilidade é mantida por até 65 dias.

Embora sementes recalcitrantes sejam metabolicamente ativas e germinem em teores de água suficientes, o armazenamento hidratado é estritamente uma opção de curto prazo (BERJAK; PAMMENTER, 2008). A proliferação de fungos associados a sementes, sob condições de armazenamento hidratado é um grande problema, especialmente para as sementes de origem tropical/sub-tropical, que quase sempre abrigam inóculo fúngico internamente (SUTHERLAND; DIEKMAN; BERJAK, 2002).

A germinação só acontece de fato quando há degradação do endosperma e as reservas finalmente podem ser utilizadas para o crescimento do embrião (BOESEWINKEL; BOUMAN, 1995).

As giberelinas (GAs) são hormônios vegetais essenciais para muitos processos de desenvolvimento, incluindo germinação da semente, alongamento do caule, expansão foliar, desenvolvimento de tricomas, maturação do pólen e indução floral (DAVIES, 1995; ACHARD; GENSCHIK, 2009).

Giberelinas são diterpenóides tetracíclicos sintetizados à partir de seu precursor, o geranilgeranil difosfato. A via de biossíntese que converte geranilgeranil difosfato as GAs biologicamente ativas, tem sido bem estudada (YAMAGUSHI; KAMIYA, 2000; OGAWA et al., 2003). Para entender o papel da giberelina no desenvolvimento desses processos na espécie em estudo é necessário estabelecer como e em quais concentrações as plantas respondem ao seu estímulo.

A síntese de giberelina é fundamental para a germinação, pois está relacionado com a síntese de enzimas hidrolíticas (α -amilase) de reserva

nutritivas, contidas no endosperma, que degradam reservas como amido e proteínas e são utilizadas para o desenvolvimento do embrião, além disso, as GAs também promovem a síntese de enzimas (endo- β -manases e expansinas) que agem enfraquecendo as paredes celulares e promove o alongamento da radícula e do caule (SCALON et al., 2009).

Estudos comprovam que o uso do ácido giberélico em sementes de diversas espécies arbóreas estimula a germinação (REIS et al., 2004; GUIMARAES et al., 2010; FEITOSA et al., 2015; FERNANDES; SOUZA-LEAL; MORAES, 2015;).

Embora muitos derivados de GAs estejam presentes em uma determinada planta, poucos são biologicamente ativos. A biossíntese parece estar firmemente ligada ao local de resposta ao GA, pois GAs bioativos são mais abundantes em tecidos de rápido crescimento (YAMAGUSHI, 2008).

Existem vários tipos de giberelinas, que variam de espécie para espécie e entre órgãos (VILLA et al., 2006). Em estudo com arroz, por exemplo, foram identificados vários tipos de GAs e os locais onde predominam na planta, de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1 - Giberelinas identificadas em arroz.

Tecido	GAs
Parte aérea	GA ₁ , GA ₄ , GA ₈ , GA ₁₉ , GA ₂₀ , GA ₂₉ , GA ₃₄ , GA ₅₃
Órgão reprodutivo	GA ₁ , GA ₄ , GA ₈ , GA ₉ , GA ₁₂ , GA ₁₇ , GA ₁₉ , GA ₂₀ , GA ₂₄ , GA ₂₉ , GA ₃₄ , GA ₄₄ , GA ₅₁ e GA ₅₃

*Adaptado de Kobayashi e Takahashi, (1991).

Enquanto para muitas espécies, as giberelinas aceleram a germinação e a emergência da plântula (SOARES et al., 2009; PIVETA et al., 2014), em outras elas apresentam pouca ou nenhuma atividade (CARVALHO, 1997; DECCETTI, 2000). Os tratamentos pré-germinativos podem otimizar de maneira uniforme a germinação, auxiliando na degradação da barreira física imposta pelo tegumento, aumentando o metabolismo das reservas e promovendo o surgimento da radícula (CASSOL et al., 2009).

Portanto, para *Plinia cauliflora*, existem poucos trabalhos utilizando tratamentos pré-germinativos para melhorar os métodos de propagação sexual. Além disso, a propagação assexuada, por meio de técnicas de cultura de tecidos, por exemplo, pode ser uma alternativa promissora tanto para a exploração comercial da espécie como para sua conservação.

2.3. Cultura de Tecidos de plantas

Um dos objetivos principais da cultura de tecidos de plantas é a rápida multiplicação massal de plantas elite. As principais vantagens com a cultura de tecidos são: produzir tecidos livres de agentes contaminantes e microrganismos; permitir o cultivo de células de qualquer planta independente a época do ano, multiplicar células e tecidos para produção de metabólitos específicos em condições ambientais controladas; controlar o crescimento celular e regulação dos processos metabólicos, reduzindo os custos e mão de obra, produzindo material vegetal em espaço reduzido e em larga escala (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998; LAKSHMANAN et al., 2005; SUSSEX, 2008; KONAN et al., 2010).

Na cultura de tecidos utilizamos pequenos fragmentos de tecido vegetal, chamados de explantes, que são inoculados assepticamente em meio nutritivo e esses fragmentos vegetais em condições ótimas podem reconstruir todo um novo organismo (LAMEIRA et al., 2000). Ao meio de cultivo podem ser acrescidos reguladores de crescimento que induzem diferentes respostas fisiológicas (HALL, 2000).

Este processo baseia-se no princípio da totipotencialidade das células, onde qualquer célula vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de um indivíduo completo (GALLO; CROCOMO, 1995; TORRES; CALDAS; FERREIRA et al., 1998; PASQUAL; HOFFMANN; RAMOS, 2001).

A cultura de tecidos em jabuticabeira tem sido utilizada para identificação de compostos bioativos com atividades antimicrobianas e antioxidantes e atividade antifúngica, como antocianinas e fenóis (SOUZA-MOREIRA et al., 2010), porém, na literatura não se encontra trabalhos de estabelecimento para a

elaboração de um protocolo de cultivo *in vitro* para a espécie. Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies, no entanto, o sucesso desse processo depende da superação de alguns problemas, como oxidação, contaminação, variabilidade genética, além disso, plantas nativas geralmente representam uma barreira para o estabelecimento e propagação *in vitro* de espécies lenhosas (LANDA, 2000).

2.4. Meio de Cultura

Para a sobrevivência no cultivo *in vitro*, o explante deve estar em contato com um fluído que mantém as células vivas por períodos longos de tempo (dias, semanas ou meses), este fluído é chamado meio de cultura (MARTIN, 1994).

O meio de cultura mais amplamente utilizado para plantas é o de Murashige e Skoog (1962), tal meio possui em sua composição sais minerais, fonte de carbono (geralmente sacarose) e vitaminas (Tabela 2):

Tabela 2 - Composição do meio de cultura de Murashige e Skoog (1962).

	Fórmula	Concentração (mg/L⁻¹)
Macronutrientes		
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	441
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25
Iodeto de potássio	KI	0,83
Micronutrientes		
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Vitaminas		
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,5
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2,0
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100,0
Ágar		7.000
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30.000

*Adaptado de: Oliveira et al., (2005).

Em alguns casos é feita a redução ou aumento na concentração desses sais, obtendo resultados satisfatórios tanto para germinação, quanto para multiplicação de explantes foliares (RUSSOWSKI; NICOLOSO, 2003; GOLLE & REINIGER, 2013; FERREIRA et al., 2016; LEMES et al., 2016). Além da escolha do meio de cultura adequado, outro problema muito comum dentro da cultura de tecidos de plantas lenhosas é a oxidação fenólica.

2.5. Oxidação fenólica

O estabelecimento *in vitro* dos explantes corresponde à primeira etapa de um sistema de micropropagação. Essa etapa inicia-se com a desinfestação e inoculação dos explantes selecionados mais adequados para a subsequente multiplicação e obtenção de uma cultura adaptada às condições *in vitro*. Diversas dificuldades podem ser encontradas ao longo das diferentes etapas do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.

Uma das principais limitações dessa técnica têm sido a produção de compostos fenólicos, que podem estar ligados a processos de regulação de crescimento e acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calos em torno da superfície incisada, que modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000) inviabilizando o desenvolvimento do explante.

Algumas recomendações foram feitas por Grattapaglia e Machado (1998), para controlar a oxidação como: lavagem do material em água corrente antes da desinfestação, utilização de antioxidantes: ácido ascórbico, polivinilpirrolidona (PVP), carvão ativado e manutenção inicial dos explantes no escuro, por exemplo.

O carvão ativado possui propriedade absorvente dos exsudados fenólicos liberados, tornando a enzima responsável pela oxidação (PPO – polifenoloxidase) inativa. Já o PVP capta elétrons e reage com os compostos oxidantes, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para se oxidarem (GEORGE, 1996; CID; TEIXEIRA, 2014), pois quanto maior a quantidade de explantes oxidados, menor a chance de conseguir estabelecer plantas *in vitro* (BEZERRA et al., 2014).

2.6. Calogênese

A calogênese é uma cultura de massa de proliferação celular e pode apresentar certo grau de diferenciação (TORRES et al., 1998; IKEUCHI, SUGIMOTO; IWASE, 2013). Os calos se desenvolvem como uma resposta a injúrias físicas ou químicas, crescendo de forma contínua.

Para se estabelecer a cultura de calos, estes passam por algumas etapas: (1) – indução, ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular; (2) – divisão celular e (3) – diferenciação, em que as células tornam-se maiores, vacuolizadas e a taxa de divisão diminui, ocorrendo o equilíbrio entre a divisão e a expansão celular (STAFFORD; WARREN, 1991).

A cultura de células/tecidos tem sido bastante utilizada em trabalhos de pesquisa envolvendo áreas como fisiologia, bioquímica e engenharia genética, etc. A totipotência das células das plantas confere flexibilidade para programas ontogênicos permitindo que células somáticas possam mudar e reverter seu estado de diferenciação em condições adequadas *in vitro* (GUEYE et al., 2009).

Existem vários agentes que interferem na formação de calos, como o tamanho do explante, a composição do meio de cultura, órgão fornecedor do explante e o genótipo da planta doadora (CERQUEIRA et al., 2002). Segundo Alves, Xavier e Otoni (2004), é comum o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calo, onde é necessário um balanço hormonal entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta, estimulando a proliferação celular.

Dependendo do explante utilizado, as vias morfogênicas (embriogênese somática e organogênese) podem ser formadas à partir de estímulos externos, de duas formas: direta através da desdiferenciação de células sem a formação de calos e a indireta através da desdiferenciação e formação de uma massa de células, chamada de calo (LEMOS, 2014). Uma das primeiras definições de "Calo" na biologia vegetal referia-se ao enorme crescimento das células e acúmulo de calose associada à injúria. Atualmente, a mesma palavra é usada também para definir massas de proliferação celular. As células dos calos podem apresentar totipotência, sendo capazes de regenerar a todo um vegetal (IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013).

Para induzir calos *in vitro*, é necessário que este seja estimulado por meio de reguladores de crescimento. É possível encontrar inúmeros reguladores de crescimento, porém, os mais utilizados na indução de calos são o 2,4-D (2,4 ácido diclorofenoxiacético) onde os explantes foliares geralmente respondem positivamente para a desdiferenciação celular e, mais recentemente, o TDZ (thidiazuron) (NOGUEIRA et al., 2007).

Estudo com *Acca sellowiana* (Myrtaceae), mostrou que tanto o uso de auxinas usadas individualmente ou combinadas com alguns tipos de citocininas é eficiente na indução de calos (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007). A indução de calos é uma das técnicas mais utilizadas para resgatar populações inteiras de mutantes, de variação somaclonal ou produção transgênica. O estabelecimento dessas populações resulta no desenvolvimento de novas cultivares (SANTOS et al., 2005).

Estudos do cultivo de calos têm sido amplamente utilizados na morfogênese e também na regeneração indireta em estudos de desenvolvimento, diferenciação celular e na exploração de produtos de origem do metabolismo primário e secundário (VASCONCELOS FILHO, 2009).

Porém, as vantagens dos dois tipos de cultivo e a conversão dos calos em órgãos dependem tanto da caracterização morfológica, quanto citológica ou bioquímica da competência celular dos calos, além disso, diante da escassez de informações referentes à organogênese e embriogênese *in vitro*, é necessário à adequação de protocolos de regeneração na tentativa de tornar esta técnica com alguma importância aplicável comprovada nos programas de micropropagação.

2.7. Análises anatômicas de calos

A análise anatômica dos calos permite identificar as características citológicas e morfológicas associados com a capacidade organogênica ou embriogênica do calo, obtidas através da manipulação dos meios de cultura e do ambiente de cultivo (NOGUEIRA et al., 2007), no entanto, algumas características são comuns, como rápida divisão mitótica, tamanho pequeno, citoplasma denso, núcleo volumoso com nucléolo proeminente, pequeno vacúolo, além disso, essas células possuem uma síntese de RNA intensa e alta atividade metabólica (STEIN et al., 2010).

Embora ainda não seja satisfatório o conhecimento acerca dos processos regenerativos *in vitro*, é de acordo que as diferentes expressões morfogenéticas refletem na natureza e no grau de diferenciação destes tecidos. Nesse sentido, muitos pesquisadores tentam relacionar as características ultra-estruturais ao potencial morfogênico, no entanto, essa caracterização citológica não tem sido

realizada com frequência na cultura de tecidos, sendo as informações muito escassas (LACERDA et al., 2015).

A histologia dos calos pode ser realizada para analisar e confirmar o detalhamento dos eventos que acontecem *in vitro*, além de avaliar o desenvolvimento das gemas adventícias (organogênese) ou de embriões somáticos (RODRIGUES et al., 2004).

O conhecimento mais detalhado dos calos através das análises estruturais e histológicas ao longo do desenvolvimento *in vitro* podem gerar informações importantes para a seleção de células com maior capacidade embriogênica, permitindo assim melhorar a produção de compostos metabólicos secundários, auxiliando no avanço no conhecimento dessa espécie (CHIAVEGATTO, 2014).

Para o sucesso dessa técnica é importante conhecer os estágios de desenvolvimento dos calos. Estudos anatômicos são importantes para mostrar as áreas meristemáticas envolvidas no processo de regeneração, auxiliando na determinação de protocolos de embriogênese somática (APPEZZATO-DA-GLORIA et al., 2005).

2.8. OBJETIVO GERAL

Objetivou-se com esse trabalho estudar a emergência de sementes e indução de calos em explantes foliares de jabuticabeira (*Plinia cauliflora*).

2.9. REFERÊNCIAS

ACHARD, P.; GENSHIK, P.; Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 4, p. 1085-1092. 2009.

ALEXANDRE, R.S.; WAGNER JÚNIOR, A.; NEGREIROS, J.R.S.; BRUCKNER, C.H. Estádio de maturação dos frutos e substratos na germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, p. 227-230. 2006.

ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430. 2004.

ANDRADE, R. A.; MARTINS, A. B. G; Influence of the temperature in germination of seeds of jaboticaba tree. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25 n.1 Jaboticabal. 2003.

ANDRADE, R. N. B.; FERREIRA, A. G.; Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 22, n. 2, p. 118-125. 2000.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNANDO, J. A.; MACHADO, S. R.; VIEIRA, M. L. C.; Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* do maracujazeiro. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados**, Planaltina, p. 387-407. 2005.

ARANTES, A. A.; MONTEIRO, R.; A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 3, n. 2, p. 111-127. 2002.

BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; Evolution of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agricola**, v. 55, n. SPE, p. 121-125. 1998.

BERJAK P.; PAMMENTER N. W.; From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, n. 2, p. 213-228. 2008.

BOESEWINKEL, F. D.; BOUMAN, F.; The seed: structure and function. **Seed Development and Germination**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 1-24. 1995.

BORTOLOTTI, I. M.; AMOROZO, M. C. M.; NETO, G. G.; OLDELAND, J.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A.; Knowledge and use of wild edible plants in rural communities along Paraguay River, Pantanal, Brazil. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 11, n. 1, p. 1. 2015.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P.; Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. p. 87-89. 2007.

CARVALHO, G. R. **Germinação de sementes e aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas "in vitro"**. 1997. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1997.

CASSOL, D. A.; JÚNIO, A. W.; ALEGRETTI, A. L.; PIROLA, K.; ZANELA, J.; MAZARO, S. M.; ESCARIFICAÇÃO E PRÉ-EMBEBIÇÃO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE AMEIXA DA MATA. **Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária-Ciências Agrárias, Animais e Florestais**. 2009.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A.; Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 301-308. 2002.

CHAVASCO, J. M.; FELIPHE, B. H. M. P.; CERDEIRA, C. D.; LEANDRO, F. D.; COELHO, L. F. L.; SILVA, J. J.; CHAVASCO, J. K.; DIAS, A. L. T.; Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13-20. 2014.

CHIN, H. F.; ROBERTS, E. H.; Recalcitrant crop seeds. **Recalcitrant crop seeds**. 1980.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B.; Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília-DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 51-66. 2010.

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

DANNER, M. A; CITADIN, I; JUNIOR, A. A. F; 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 Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1. p. 179-182. 2007.

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

DAVIES, P.J.; (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Springer Science & Business Media. 2013.

DECCEITI, S. F. C.; DECCEITI, S. F. C. **Propagação in vitro de Annona glabra** L. UFLA. 2000.

DELGADO, L. F.; BARBEDO, C. J; Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 442, n. 2, p. 265-272. 2007.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A.; **Frutas Brasileiras**. Jaboticabal, 288 p. 2002.

ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L. B.; DELAMARE, A. P. L.; ZENI, A. L. B.; CARRER, R.; Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. **TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária**, p. 257-276. 2001.

FEITOSA, F. M.; JÚNIOR, I. O. A.; DAVID, A. M. S. S.; RODRIGUES, B. R. A.; DAMASCENA, N. S.; ARAÚJO, E. D.; AMARO, H. T. R.; Efeito dos reguladores giberelina e citocinina na quebra de dormência de sementes de capim-andropogon. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 34-40. 2015.

FERNANDES, F. S.; SOUZA-LEAL, T.; MORAES, C. P.; Germinação de Sementes de Amor-Perfeito Submetidas a Diferentes Períodos de Exposição e Concentrações de GA₃. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 8, n. 3, p. 601-614. 2015.

FERREIRA, R.; VARELLA, T. L.; HUNHOFF, V. L.; SILVA, M. L.; GERMINAÇÃO IN VITRO DE SEMENTES DE NONI (*Morinda citrifolia* L.). **Biodiversidade**, v. 15, n. 1. 2016.

FIGLIOLIA, M. B.; Colheita de sementes. In: SILVA, A.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Insitudo Florestal, v. 14, p. 1-12, Série Registros. 1995.

FINCH-SAVAGE, W. E.; FOOTITT, S.; To germinate or not to germinate: a question of dormancy relief not germination stimulation. **Seed Science Research**, v. 22, p. 243-248. 2012.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B.; Sementes Recalcitrantes: Problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.2, p.297-303. 2003.

FOWLER, J. A. P.; MARTINS, E. G.; Coleta de sementes. In: **Manejo de sementes de espécies florestais. Colombo: EMBRAPA Florestas**, 2001. p. 9-13. Documentos, 58. 2001.

GALLO L. A; CROCOMO O. J.; A cultura de tecidos em fitopatologia. In: FILHO AB; KIMATI H; AMORIM L. (eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres**. p.495-505. 1995.

GEORGE, E. F.; Plant propagation by tissue culture: part.2 –In Practice. 2.ed. **Edington: Exegetics**, 1361 p. 1996.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; BELLÉ, R. A.; CURTI, A. R.; Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n.1, p. 77-82. 2013.

GOMES, J. P.; OLIVEIRA, L. M.; FERREIRA, P. I.; BATISTA, F.; Substratos e temperaturas para teste de germinação em sementes de Myrtaceae. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.26, n.4, p. 285-293. 2016.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; LUGHADHA, E. N.; PRONEÇA, C.; SOARES-SILVA, L. H.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. **World checklist of Myrtaceae**. Royal Botanic Gardens. 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.; Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq. 1998.

GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D.; HILBERT, J. -L.; VERDEIL, J. -L.; BLERVACQ, A. -S.; Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways?. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 98, n. 1, p. 47-58. 2009.

GUIMARÃES, M. A.; VIDIGAL, D. S.; LOUREIRO, M. E.; DIAS, D. C. F. S.; GUIMARÃES, A. R.; Influência de temperatura, luz e giberelina na germinação de sementes de *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl (Brassicaceae). **Ceres**, v. 57, n. 3. 2015.

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, K.; NAKANISHI, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; KADOTA, T.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; IMAIDA, K.; ITO, N.; SHIRAI, T. HAGIWARA, Akihiro et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1, 2-dimethylhydrazine. **Cancer letters**, v. 171, n. 1, p. 17-25. 2001.

HALL, A. E.; **Crop responses to environment**. CRC press. 2000.

HILHORST, H. W. M.; New aspects of seed dormancy. In: COME, E.; COMBINEAU, F.; (Eds). In: International workshop on seeds: Basic and applied aspects of seed biology, 4., Paris. **Proceedings...** Paris, University Pierre et Marie Curie, p. 551-579. 1993. IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A.; Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The plant cell**, v. 25, n. 9, p. 3159-3173. 2013.

KAPADIA, G.J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H.I.; WASHINA, A.; NISHINO, H.; Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein-Barr virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer letters**, v. 115, n. 2, p. 173-178. 1997.

KOBAYASHI, M.; TAKAHASHI, N.; Organ-specific gibberellins in rice: roles and biosynthesis. In: **Gibberellins**. Springer New York, p. 9-21. 1991.

KOHAMA, S.; MALUF, A. M.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J.; Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 72-78. 2006.

KONAN, K. E.; DURANT-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C.; *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant cell reports**, v. 29, n. 1, p. 1-13. 2010.

KUSKOSKI, E. M.; VEGA, J. M.; RIOS, J. J.; FETT, R.; TRONCOSO, A. M.; ASUERO, A. G.; Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5450-5454. 2003.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. P. L.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R.; Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 4, p. 345-363. 2005.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C.; PINTO, J. E. B. P.; Cultura de tecido: manual. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 41 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66). 2000.

LEMES, C. S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciencia Rural**, v.46 n.3, Santa Maria. 2016.

LEMOS, E. E. P.; Organogênese. In: CID, L. P. B.; Cultivo *in vitro* de Plantas. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. 2010.

LI, D.Z.; PRITCHARD, H. W.; LI, The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in plant science**, v. 14, n. 11, p. 614-621. 2009.

LIS-BALCHIN, M.; HARS, S. L.; DEANS, S. G.; Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or Manuka and *Kunzea ericoides* or Kanuka), originating in Australia and New Zealand. **Phytotherapy research**, v. 14, n. 8, p. 623-629. 2000.

MALUF, A. M.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J.; Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, p. 471-475. 2003.

MANICA, I.; **Frutas nativas, silvestres e exóticas: Técnicas de produção e mercado--abiú, amora-preta, araçá, bacuri biribá, carambola, cereja-do-reo-grande, jabuticaba**. Cinco Continentes Editora. 2000.

MARTIN, B. M.; Routine cell culture. In: **Tissue Culture Techniques**. Birkhäuser Boston, p. 29-90. 1994.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; CARVALINO, A. M.; SANTOS, T. S.; Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica**, v.15, n.1, p. 68-70. 1983.

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.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O.; Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370. 2007.

OGAWA, M.; HANADA, A.; YAMAUCHI, Y.; KUWAHARA, A.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S.; Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. **The Plant Cell**, v. 15, n. 7, p. 1591-1604. 2003.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X.; BRAHM, R. U.; **Produção de matrizes de morangueiro por meio de cultura de tecidos**. 2005.

PALOMBI, M. A.; LOMBARDO, B.; CABONI, E.; *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyraster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. **Plant cell reports**, v. 26, n. 4, p. 489-496. 2007.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P.; Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia kirkii*. **Plant Physiology**, v. 96, n. 4, p. 1093-1098, 1991.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D.; Cultura de tecidos - tecnologia e aplicações. Introdução: Situação e Perspectivas. **Lavras: UFLA/FAEPE**. 1997.

PEREIRA, M.; **Propagação via estacas apicais, caracterização morfológica e molecular de jabuticabeiras (*Myrciaria* spp)**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PINTO, G.; ARAUJO, C.; SANTOS, C.; NEVES, L.; Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural approach. **Trees**, Santa Monica, v. 25, n. 3, p. 383–392. 2011.

PIROLA, K.; JUNIOR, A. W.; CASSOL, D. A.; ALEGRETTI, A. L.; MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO SOBRE A GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE JABUTICABEIRAS 'AÇÚ'E 'DE CABINHO'. **XIV SICITE - UTFPR - Volume I - Seção Agronomia**. 2009.

PIROLA, K.; Caracterização fisiológica e conservação de sementes de oito fruteiras nativas do bioma floresta com araucária. UFTPR. **Dissertação de mestrado**. 2013.

PIVETA, G.; MUNIZ, M. F. B.; REINIGER, L. R. S.; DUTRA, C. B.; PACHECO, C.; Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de Aroeira-preta (*Lithraea molleoides*) submetidas a métodos de superação de dormência. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 2, p. 289-297. 2014.

POPIGINIS, F.; Fisiologia da semente. **Brasília: Agiplan**, v. 2, 1985.

REIS, J. M. R.; CHALFUN, N. N. J.; REIS, M. A.; VILLA, F.; ROFRIGUES, J. F.; Efeito do GA₃ na germinação e produção de porta-enxertos de pessegueiro 'Okinawa' conduzidos em diferentes ambientes. **Ceres**, v.51, n. 297. 2004.

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

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F. T.; Nitrogênio e Fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, p.57-63. 2003.

SACANDÉ, M.; JOKER, D.; DULLOO, M. E.; THOMPSEN, K. A.; **Comparative storage biology of tropical tree seeds**. IPGRI, Roma (Italia). 2004.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W.; Plant Physiology. 4 ed. California: Wadsworth, 682 p. 1992.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, P. D. O.; Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 510-514, 2005.

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

SCALON, S. P. Q.; LIMA, A. A.; FILHO, H. S.; VIEIRA, M. C.; Germinação de sementes e crescimento inicial de mudas de *Campomanesia adamantium* Camb.: Efeito da lavagem, temperatura e de bioestimulantes. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 2, p.096-103. 2009.

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.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃, e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1847 -1852. 2009.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E.; Myrtaceae in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>, (acesso em: 27 Fev. 15).

SOBRAL, M.; Alterações nomenclaturais em *Plinia* (Myrtaceae). **Boletim do Museu Botânico de Curitiba**, Curitiba, n.63, p.1-4. 1985.

SOUSA, C.; Filogenia Molecular das Jaboticabas: Elucidando relações evolutivas e identidade genérica de um fruto genuinamente brasileiro. 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3^a. Ed. Plantarum, Nova Odessa, 768p. 2012.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.1, p. 48-53. 2010.

STAFFORD, A.; WARREN, G.; **Plant cell and tissue culture**. Open University Press. 1991.

STEFANELLO, M. E. A; PASCOAL, A. C. R. F; SALVADOR, M. J; Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94. 2011.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; VARGAS, D. P.; Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 53, n. 2, p. 159-163. 2010.

SUSSEX, I. M.; The scientific roots of modern plant biotechnology. **The Plant Cell**, v. 20, n. 5, p. 1189-1198. 2008.

SUTHERLAND, J. R.; DIEKMANN, M.; BERJAK, P.; **Forest tree seed health for germplasm conservation**. IPGRI, 2002.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A.; Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Ceres**, Viçosa, v.55, n.4, p.297-304. 2008.

THORPE, T.; History of plant tissue culture. **Plant cell culture protocols**, p. 9-32. 2006.

TORRES, A. C; CALDAS, L. S; FERREIRA, A. T; Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. **Cultura de tecidos e transformação e genética de plantas**. 1998.

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.

VASCONCELOS FILHO, S. C.; Caracterização anatômica e histoquímica de folhas, calogênese e fitoquímica de calos de murici [*Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich. Ex ss]. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Viçosa, 82 f. 2009.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; TEODORO, G. S.; MIYATA, L. Y.; VILLA, Multiplicação *in vitro* de Amoreira-Preta 'Cherokee': Efeito de meios de cultura, cinetina e GA₃. **Ceres**, v. 53, n. 307, p. 357-362. 2006.

WANG, C.J.; WANG, J.M.; LIN, W.L.; CHU, C.Y.; CHOU, F.P.; TSENG, T.H. Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hidroperoxideinduced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.38, n.5, p.411-416. 2000.

YAMAGUCHI, S.; Gibberellin metabolism and its regulation. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 225-251, 2008.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y.; Gibberellin Biosynthesis: Its Regulation by Endogenous and Environmental Signals. **Plant Cell Physiology**. v.41, n.3, p. 251- 257. 2000.

3. EMERGÊNCIA DE SEMENTES DE *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel PRÉ-TRATADAS COM GIBERELINA

RESUMO – A jabuticabeira é uma planta frutífera de grande importância alimentar, medicinal e comercial. Faz parte de uma das famílias botânicas mais importantes do Brasil, a família Myrtaceae. Porém, o comércio possui dificuldade em expandir seu cultivo, pois a muda de Jabuticabeira tem um alto custo, além disso, se trata de uma espécie difícil de multiplicar vegetativamente, com dificuldade no enraizamento de estacas caulinares. Objetivou-se com o trabalho, verificar o efeito do GA₃ na germinação e desenvolvimento de plântulas. Para

isso, frutos de jabuticabeira foram coletados e despulpados. As sementes foram imersas por 24 horas em diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 1000 e 2000 mg.L⁻¹). Após as 24 horas, as sementes foram colocadas em tubetes de 290 cm³ com substrato plantmax. A germinação foi conduzida em casa de vegetação com sistema automático de irrigação. Após 30, 45 e 60 dias após a semeadura (DAS) foram avaliadas as variáveis: emergência, tamanho do caule (cm) e número de folhas. Com base nos resultados é possível afirmar que s sementes embebidas em GA₃ na concentração de 1000 mg.L⁻¹ por 24 horas diminuiu o tempo de emergência de jabuticabeira nas condições apresentadas nesse trabalho. Para o crescimento e número de folhas, os tratamentos pré-germinativos nas concentrações de 1000 mg.L⁻¹ e 2000 mg.L⁻¹ do regulador por 24 horas foi eficiente comparados ao tratamento controle. No entanto, para diminuir os custos, a quantidade de 1000 mg.L⁻¹ é eficiente.

Palavras-chave: jabuticaba, giberelina, semente recalcitrante, myrtaceae
EMERGENCY OF *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel SEEDS PRE-TREATED WITH GIBBERELLIN

SUMMARY – The jabuticabeira is a fruit plant of great importance food, medicinal and commercial. Take part in one of the most important plant families in Brazil, the Myrtaceae family. But trade has difficulty in expanding its cultivation, because the plant seedlings of Jabuticabeira has a high cost, in addition, it is a difficult species to multiply vegetatively, with difficulty in rooting cuttings. The objective of the study was to verify the effect of GA₃ on germination and seedling development. For this, jabuticabeira fruits were collected and unpulped. The seeds were immersed for 24 hours at different concentrations of GA₃ (0, 250, 500, 1000 and 2000 mg L⁻¹). After 24 hours, the seeds were placed in tubes of

290 cm³ with plantmax substrate. The germination was conducted in a greenhouse with automatic irrigation system. After 30, 45 and 60 days after sowing (DAS) variables were evaluated: emergency, stem size (cm) and number of leaves. Based on the results we can say that seeds immersed in GA₃ at 1000 mg.L⁻¹ for 24 hours decreased the jabuticabeira emergency time under the conditions presented in this work. For growth and number of sheets, pre-germination treatments in concentrations of 1000 mg.L⁻¹ and 2000 mg.L⁻¹ regulator for 24 hours it was efficient compared to the control treatment. However, to reduce costs, the amount of 1000 mg.L⁻¹ is effective.

Keywords: jabuticaba, gibberellin, recalcitrant seeds, myrtaceae

3.1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae distribui-se por quase todos os continentes, predominando nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É uma das famílias botânicas mais importantes do Brasil, compreendendo cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies, entre árvores e arbustos (SOUZA; LORENZI, 2012).

As espécies do gênero *Plinia* possuem grande potencial econômico, e dentre as espécies, *Plinia cauliflora* (Mart.), Kausel), nativa do Brasil e conhecida popularmente como Jabuticabeira, se destaca pelo potencial econômico,

alimentar e medicinal. A jabuticabeira apresenta alta produtividade de frutos, mesmo sem a utilização de práticas adequadas de manejo e esses frutos são utilizados para fins diversos, como a fabricação de vinhos, licores, geleias e sucos, além do seu consumo *in natura* (DANNER et al., 2007; BORTOLOTTO et al., 2015). Como a espécie apresenta longo período de juvenilidade e curto período reprodutivo, há dificuldade na produção de mudas (HARTMANN et al., 2002).

Porém, um dos maiores problemas enfrentados para a expansão do cultivo de jabuticabeira é o alto custo das mudas, pois é uma espécie difícil de multiplicar vegetativamente (SCARPARE FILHO et al., 1999; PEREIRA et al., 2005). Por isso, a principal forma de produção de mudas é por sementes, ainda, essas sementes de jabuticabeira perdem rapidamente a viabilidade, pois são consideradas como recalcitrantes (VALIO; FERREIRA, 1992).

As informações existentes sobre jabuticabeira na literatura abordando germinação de sementes ou mesmo a formação de mudas são escassas, e, além disso, existem dúvidas quanto a presença ou não de dormência em suas sementes (VALIO; FERREIRA, 1992). O uso de GA₃ em sementes é uma alternativa que visa aumentar o índice de germinação, além de melhorar o desenvolvimento de plântulas (SCALON et al., 2006; CAMPOS et al., 2015).

3.2. OBJETIVO

Verificar o efeito do GA₃ na emergência e no desenvolvimento de plântulas de jabuticabeira.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação da Universidade Federal de Goiás, Campus Cidade Universitária - Regional Jatai. As sementes de jabuticaba foram coletadas no dia 28 de fevereiro de 2015 na zona rural, fazenda Indaiá, Jataí – GO – Brasil, com as seguintes coordenadas: [lat: -17.87 long: -46.064167 WGS84] e uma amostra está tombada no Herbário Jataiense (UFG), com o registro HJ 7419.

Os frutos maduros foram lavados em água corrente, por cerca de 1 minuto, em seguida foi realizado o despulpamento para isolamento das sementes. Depois de isoladas as sementes foram imersas, por 24 horas, em diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 1000 e 2000 mg.L⁻¹). Foram imersas 24 sementes por tratamento.

Após as 24 horas, as sementes foram colocadas em tubetes de 290 cm³ com substrato plantmax, com aproximadamente 1 centímetro de profundidade.

A germinação foi conduzida em casa de vegetação com sistema automático de irrigação, sendo que as irrigações foram realizadas sempre no período da manhã (09:00h) e da tarde (16:00h), aplicando-se uma lâmina diária de 5 mm para manter a umidade do solo.

Aos 30, 45 e 60 dias após a semeadura (DAS) foram avaliadas as variáveis: porcentagem de emergência, tamanho do caule (cm) e número de folhas. A semente foi considerada emergida verificando o surgimento do caulículo acima do substrato, de acordo com Campos *et al.*, (2015).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado composto de 5 tratamentos com 24 repetições e a análise estatística com os dados de emergência submetidos a análise de regressão, o tamanho da parte aérea e número de folhas foram avaliados pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando-se o software Assistat (SOUZA; AZEVEDO, 2015).

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, encontram-se os valores ajustados de emergência observados, em função das doses de ácido giberélico (GA₃) aplicados aos 30 dias. Observou-se comportamento diretamente proporcional em que o aumento da concentração de GA₃ aumentou aos 30 dias.

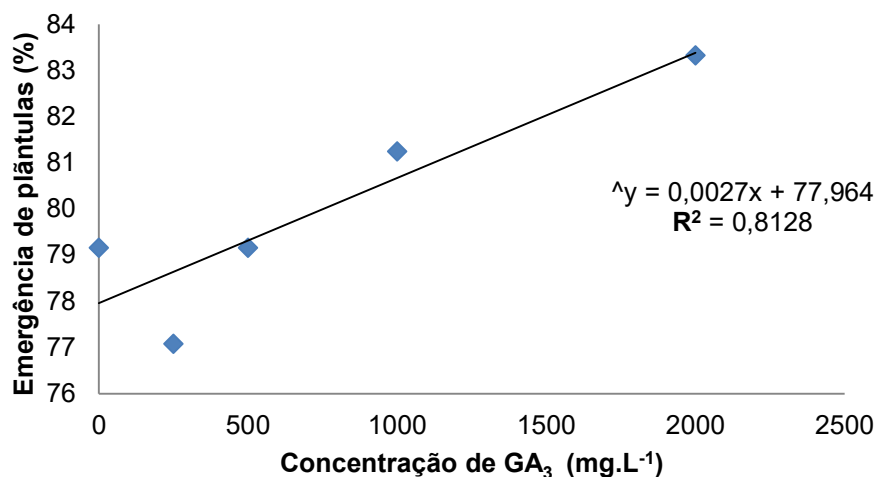


Figura 1. Porcentagem de emergência de plântulas em função da concentração de GA₃ aos 30 dias de cultivo de jaboticabeira

Resultado semelhante foi encontrado por Santos et al., (2013) com sementes de *Passiflora edulis*, onde a pré-embebição das sementes por 6 horas na quantidade de 100 mg.L⁻¹ foi o melhor tratamento. Melo et al., (2000) obtiveram resultados positivos para a emergência de plântulas de *Passiflora nitida*, que foram tratadas com 1500 e 2000 mg.L⁻¹ de GA₃.

O GA₃ é usado na tentativa de aumentar a porcentagem e uniformidade de germinação de sementes, sendo um fator importante para aumentar o potencial de desempenho das sementes, uniformizando as plantas em condições de campo (FERREIRA; FOGAÇA; BLOEDORN, 2001; ARAGÃO et al., 2003).

Nas Figuras 2 e 3, encontram-se os valores médios observados de emergência, em função das doses de ácido giberélico (GA₃) aos 45 e 60 dias respectivamente, e nesse período o melhor tratamento foi o de 1000 mg.L⁻¹, um aumento em torno de 20% de emergência, comparado ao tratamento controle.

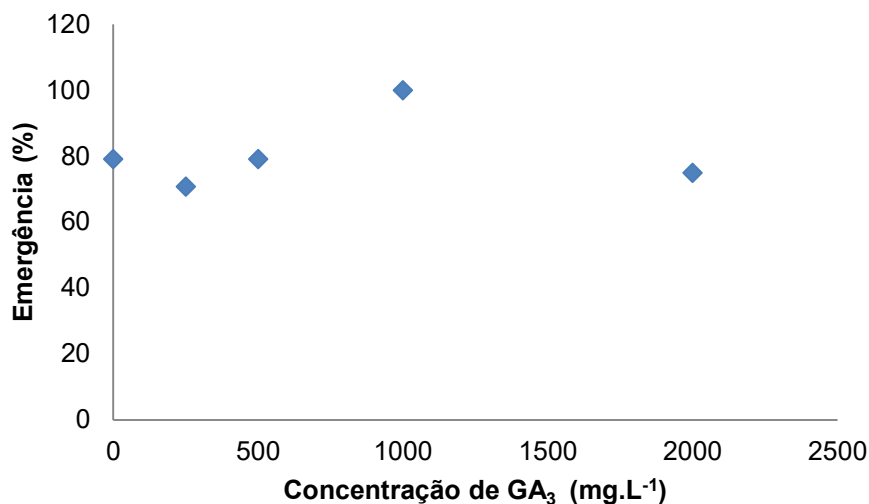


Figura 2. Porcentagem de emergência de plântulas em função da concentração de GA₃ aos 45 dias de cultivo de jabuticabeira

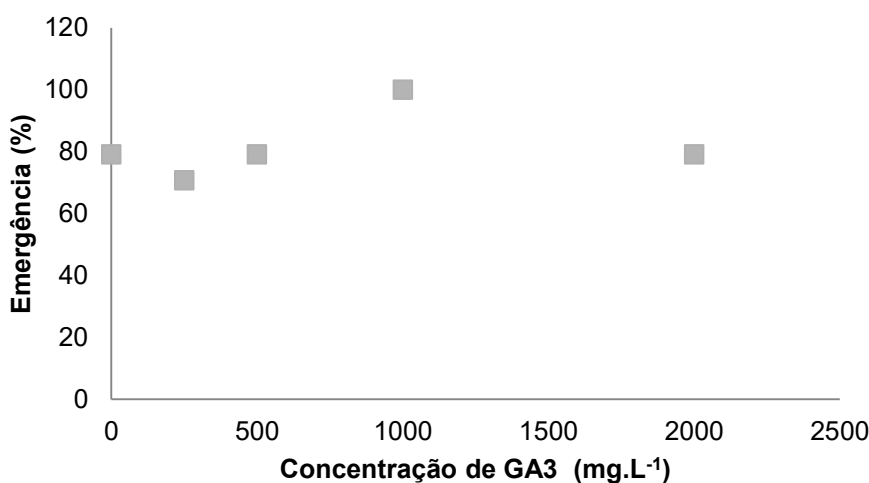


Figura 3. Porcentagem de emergência de plântulas em função da concentração de GA₃ aos 60 dias de cultivo de jabuticabeira

A emergência das primeiras plântulas de jabuticabeira aconteceu aproximadamente aos 15 dias após a semeadura (DAS). Donadio (2000), verificou que a germinação de sementes de jabuticabeira ocorre entre 10 e 40 dias após a semeadura, estando os dados de acordo com os observados no presente estudo.

Em trabalho conduzido com jabuticabeira por Dias et al., (2011), a maior porcentagem de germinação foi de 42% utilizando terra+areia+esterco e sem o uso do regulador, resultado diferente dos obtidos nesse estudo, isso mostra que

além do tempo de embebição, outros fatores podem influenciar na diferença de germinação, como a idade fisiológica da semente, o clima, a temperatura e o substrato.

A pré embebição de *Eugenia candolleana* (Myrtaceae) em água ou GA₃ não aceleram o processo germinativo na espécie (CASSOL et al., 2009), estando divergentes dos resultados observados no presente estudo aos 45 e 60 dias, onde a concentração de 1000 mg.L⁻¹ mostrou uma maior porcentagem de emergência ao final das avaliações.

Para as variáveis tamanho da parte aérea e número de folhas foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos, exceto entre os tratamentos de 1000 mg.L⁻¹ e 2000 mg.L⁻¹ que apresentaram-se semelhantes (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Tamanho médio da parte aérea (cm) de jabuticabeira (*Plinia cauliflora*), após tratamento pré-germinativo com diferentes concentrações de GA₃, aos 30, 45 e 60 dias.

¹ GA ₃ mg.L ⁻¹	30 dias (cm)	45 dias (cm)	60 dias (cm)
0	2,93 b	4,22 b	4,37 b
250	3,10 b	4,79 b	3,81 b
500	2,80 b	4,31 b	4,41 b
1000	5,91 a	7,27 a	7,47 a
2000	4,48 ab	5,37 ab	5,60 ab

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ¹GA₃– Ácido giberélico;

Tabela 4 – Número médio de folhas de jabuticabeira (*Plinia cauliflora*), após tratamento pré-germinativo com diferentes concentrações de GA₃, aos 30, 45 e 60 dias

¹ GA ₃ (mg.L ⁻¹)	30 dias (cm)	45 dias (cm)	60 dias (cm)
0	2,12 b	4,58 b	6,20 b
250	3,95 b	4,41 b	7,45 b
500	2,29 b	4,16 b	7,37 b
1000	7,91 a	9,25 a	13,41 a
2000	4,91 ab	5,41 b	8,58 ab

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ¹GA₃– Ácido giberélico;

O ácido giberélico na concentração de 1000 mg.L⁻¹ foi eficiente na promoção do crescimento da parte aérea das mudas e no número de folhas de jabuticabeira. O GA₃ estimula o alongamento e a divisão celular, crescimento do

caule, florescimento, desenvolvimento do fruto e semente e aumenta o desenvolvimento da parte aérea (CHIARELO et al., 2007).

A promoção do alongamento celular promove maior crescimento das plantas, importante para a produção de mudas. Isso é bem evidenciado em trabalho de Ono, Junior e Rodrigues (2004), estudando os efeitos do GA₃ no crescimento de *Carica papaya*, onde os tratamentos das plantas com GA₃ 125 mg.L⁻¹ + BA (Benziladenina) 125 mg.L⁻¹ e GA₃ 250 mg.L⁻¹ + BA 250 mg.L⁻¹ promoveu o desenvolvimento das brotações laterais e o posterior crescimento destas.

Silva et al., (2014), estudando as concentrações e métodos de aplicação de ácido giberélico em sementes de *Citrullus lanatus* (melancia) constatou que o comprimento da parte aérea foi influenciado positivamente pela presença do GA₃, uma vez que os tratamentos com este regulador apresentaram maiores valores em comprimento quando comparados com a testemunha e também promoveu maior ganho em massa seca da parte aérea quando comparadas à testemunha, sendo o primeiro resultado de acordo com o desse experimento.

Em estudo conduzido com *Saintpaulia ionantha* (violeta) por Paiva et al., (1997), o GA₃ não auxiliou na germinação, porém atuou no alongamento da parte aérea, como verificado na jabuticabeira. Outro trabalho de Leonel e Pedroso (2005), mostrou comportamento semelhante, onde aumentos significativos na altura e número de folhas de plântulas de *Passiflora alata* foram observados em plantas pulverizadas com 300 mg.L⁻¹ de GA₃, entretanto, não foram observadas diferenças para a porcentagem de emergência, resultados similares aos desse trabalho, onde a altura e número de folhas foram influenciados positivamente nas concentrações de 1000 e 2000 mg.L⁻¹ de GA₃.

Em trabalho conduzido por Soares et al., (2009), com *Cattleya loddigesii* e *Hadrolaelia lobatta* x *Hadrolaelia purpurata* (orquídea e um híbrido de orquídea), a utilização de 2,5 mg.L⁻¹ foi eficiente no incremento no número de folhas para a orquídea, já para o híbrido o GA₃ não obteve nenhum efeito.

O maior comprimento das plântulas e número de folhas é importante, pois auxilia as plântulas no campo para aguentar as intempéries, além disso, maior biomassa permite aumento na cobertura do solo e por outro lado, maior teor de matéria orgânica, trazendo benefícios como maior infiltração e armazenamento

de água no solo, drenagem, aeração e interferência direta na resistência mecânica do solo (SUZUKI; ALVES, 2006).

A composição e a concentração de reguladores de crescimento são fatores importantes que determinam o crescimento e o padrão de desenvolvimento de muitos sistemas de plantio. Os reguladores de crescimento são compostos que atuam em vários processos do desenvolvimento das plantas em baixas concentrações (SOUZA; PEREIRA, 2007).

3.5. CONCLUSÃO

As sementes embebidas em GA₃ na concentração de 1000 mg.L⁻¹ por 24 horas diminuiu o tempo de emergência de jaboticabeira nas condições apresentadas nesse trabalho. Para o crescimento (cm) e número de folhas, os tratamentos pré-germinativos nas concentrações de 1000 mg.L⁻¹ e 2000 mg.L⁻¹ do regulador por 24 horas foi eficiente comparados ao tratamento controle. No entanto, para diminuir os custos, a quantidade de 1000 mg.L⁻¹ é eficiente.

3.6. REFERÊNCIAS

ALEGRETTI, A. L.; JUNIOR, A. W.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I.; Métodos de quebra de dormência de sementes de jaboticabeira. **XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**. 2012.

ALEGRETTI, A. L.; JUNIOR, A. W.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I.; Métodos de quebra de dormência de sementes de jaboticabeira. **XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**. 2012.

ALEGRETTI, A. L.; JUNIOR, A. W.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I.; Métodos de quebra de dormência de sementes de jaboticabeira. **XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**. 2012.

ARAGÃO, C. A.; DANTAS, B. F.; ALVES, E.; CATANEO, A. C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J.; Atividade aminolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doces tratadas com ácido giberélico. **Revista Brasileira de Sementes**. v.25, n.1 p. 43-48, 2003.

ALEGRETTI, A. L.; JUNIOR, A. W.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I.; Métodos de quebra de dormência de sementes de jaboticabeira. **XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**. 2012.

BORTOLOTTO, I. M.; AMOROZO, M. CC. M.; NETO, G. G.; OLDELAND, J.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A.; Knowledge and use of wild edible plants in rural communities along Paraguay river, Pantanal, Brazil. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, 2015.

CAMPOS, L. F. C.; ABREU, C. M.; GUIMARAES, R. N.; SELEGUINI, A.; Escarificação e ácido giberélico na emergência e crescimento de pântulas de biribá. **Ciência Rural**, v. 15, n. 10. Santa Maria, 2015.

ALEGRETTI, A. L.; JUNIOR, A. W.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I.; Métodos de quebra de dormência de sementes de jaboticabeira. **XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**. 2012.

ALEGRETTI, A. L.; JUNIOR, A. W.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I.; Métodos de quebra de dormência de sementes de jaboticabeira. **XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**. 2012.

CHIARELO, C.; GOMES, A. D. S.; PEREIRA, R. D.; WINKLER, A. S.; Efeitos do uso de stimulate no desempenho da cultura do arroz irrigado. In: Congresso de iniciação científica, 16. Pelotas. Anais, UFPEL. 2007.

DANNER, M. A; CITADIN, I; JUNIOR, A. A. F; 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 Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1. p. 179-182, 2007.

DIAS, M. A.; LOPES, J. C.; NETO, J. D. S.; HEBERLE, E.; Influência da temperatura e substrato na germinação de sementes de jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). **Idesia (Arica)**, v. 29, n. 1, p. 23-27, 2011.

DONADIO, L. C.; Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Série Frutas Nativas**, 3 ed. Jaboticabal, FUNEP, 55 p., 2000.

FERREIRA, G.; FOGAÇA, L. A.; BLOEDORN, M.; Efeito do ácido giberélico (GA₃) aplicado em sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander) para a produção de mudas em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p. 126-129, 2001.

FERREIRA, G.; FOGAÇA, L. A.; BLOEDORN, M.; Efeito do ácido giberélico (GA₃) aplicado em sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander) para a produção de mudas em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.126-129, 2001.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D. E.; JUNIOR, F. T. D.; GENEVE, R. L.; **Plant propagation: principles and practices**. Prentice-Hall Inc., 1997.

LEONEL, S.; PEDROSO, C. J.; Produção de mudas de maracujazeiro-doce com o uso de biorregulador. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.1, p.107-109, 2005.

MELO, A. L.; OLIVEIRA, J. C.; VIEIRA, R. D.; Superação de dormência em sementes de *Passiflora nítida* H.B.K. com hidróxido de cálcio, ácido sulfúrico e ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p. 463-467, 2000.

MELO, A. L.; OLIVEIRA, J. C.; VIEIRA, R. D.; Superação de dormência em sementes de *Passiflora nítida* H.B.K. com hidróxido de cálcio, ácido sulfúrico e ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p. 463-467. 2000.

ONO, E. O.; JUNIOR, J. F. G.; RODRIGUES, J. D.; Reguladores vegetais na quebra da dominância apical de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 2, p. 348-350, 2004.

PAIVA, P. D. O.; JOSÉ, S. C. B. R.; PASQUAL, M.; PAIVA, R.; Efeito do ácido naftaleno acético e GA₃ na micropropagação de violeta. **Revista Ceres**, 44(254): 392-398, 1997.

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

SANTOS, C. A. C.; VIEIRA, E. L.; PEIXOTO C. P.; LEDO, C. A. S.; Germinação de sementes e vigor de plântulas de maracujazeiro amarelo submetidos à ação do ácido giberélico. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 29, n.2, p. 400-407, 2013.

SANTOS, C. A. C.; VIEIRA, E. L.; PEIXOTO C. P.; LEDO, C. A. S.; Germinação de sementes e vigor de plântulas de maracujazeiro amarelo submetidos à ação do ácido giberélico. **Biosci. J.**; Uberlândia, v. 29, n.2, p. 400-407, mar/abr. 2013.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; FILHO, H. S.; FRANCELINO, C. S. F.; FLORENCIO, D. K. A.; Armazenamento e tratamentos pré-germinativos em sementes de Jacarandá (*Jacaranda cuspidifolia* Mart.). **Revista Árvore**. Viçosa, v. 30, n.2, p.179-185. 2006.

SCARPARE-FILHO, J. A.; NETO, J. T.; COSTA, J. W. H.; KLUGE, R. A. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de jaboticabeira sabará (*Myrciaria jaboticaba*), em condições de nebulização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.146-149, 1999.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V.; Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, T. C. F. S.; SILVA, R. C. B.; SILVA, J. E. S. B.; SANTOS, R. S.; ARAGÃO, C. A.; DANTAS, B. F.; Germinação de sementes de melancia sob diferentes métodos de tratamento com reguladores vegetais. **Scientia Plena**, vol. 10, n.03. 2014.

SOARES, J. D. R.; ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; ASSIS, F. A.; Concentrações de sais no meio Knudson C e de ácido giberélico no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 772-777, 2009.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M S.; Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-116, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3^a. Ed. Plantarum, Nova Odessa, 768p. 2012.

SUZUKI, L. E. A. S.; ALVES, M. C.; Fitomassa de plantas de cobertura em diferentes sucessões de culturas e sistemas de cultivo. **Bragantia**, v.65, p.121-127, 2006.

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

VIVIAN, R.; SILVA, A. A.; GIMENES, JR., M.; FAGAN, E. B.; RUIZ, S. T.; LABONIA, V.; Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência – Breve Revisão. **Planta Daninha**, Viçosa – MG, v.26, n.3, p. 695-706, 2008.

4. CALOGÊNESE E ANÁLISES ANATÔMICAS EM CALOS DE EXPLANTES FOLIARES DE *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel

RESUMO – *Plinia cauliflora* é conhecida como jabuticabeira, possui importância alimentar, medicinal e econômica. Seus frutos são muito apreciados para consumo tanto *in natura*, quanto para sucos, geléias, licores e doces. As sementes de jabuticabeira são consideradas recalcitrantes, dificultando sua propagação. Objetivou-se com este trabalho definir o melhor antioxidante, promover a indução de calos e analisar anatomicamente os calos provenientes de explantes foliares de jabuticabeira. Para determinar o melhor antioxidante, explantes foliares, oriundos de plântulas de jabuticabeira mantidas em casa de vegetação, foram lavados com água corrente e inoculados em meio MS acrescido de PVP (0; 0.5; 1.0; ou 2.0) combinado com diferentes porcentagens de carvão ativado (0; 2 ou 4%). Após 30, 45 e 60 dias foram avaliados a presença ou ausência de oxidação dos explantes. O delineamento experimental utilizado foi fatorial 4 PVP x 3 carvão ativado com 15 repetições cada tratamento. Para a calogênese, os explantes foram inoculados em meio MS com diferentes combinações dos reguladores 2,4-D e BAP e o delineamento experimental utilizado foi fatorial 4 2,4-D x 3 BAP com 20 repetições cada tratamento. Para calogênese com ANA e BAP, os explantes foram inoculados em meio MS com diferentes combinações dos reguladores e o delineamento experimental utilizado foi fatorial 4 ANA x 3 BAP com 20 repetições cada tratamento. Os dados normais foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância ou comparados através de modelos lineares generalizados pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% utilizando-se o software Assistat. Para as avaliações anatômicas, calos oriundos do experimento 2,4-D e BAP foram coletados, fixados e preparados em lâminas histológicas. Com base nos resultados, é indicado a concentração de 2% de carvão ativo combinado com 2,0 mg.L⁻¹ de PVP para o controle da oxidação. Para a obtenção de calos o mais indicado é apenas inocular em meio MS sem a adição de regulador de crescimento. Após avaliação anatômica, o balanço indicado para cultivo de calos com potencial morfogênico foi o tratamento com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ de BAP.

Palavras-chave: jabuticaba, calogênese, antioxidante, oxidação

CALOGENESIS, AND ANATOMIC ANALYSIS CHARACTERIZATION IN LEAF EXPLANTS OF *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel

SUMMARY – *Plinia cauliflora* is known as jabuticabeira, it has important food, medicinal and economic. Its fruits are highly appreciated for consumption both in natura, as for juices, jams, liqueurs and sweets. The jabuticabeira seeds are classified as recalcitrant, making it difficult to spread. The objective of this work is define the best antioxidant, promote callus induction and analyze anatomically calluses from leaf explants of jabuticabeira. To determine the best antioxidant, leaf explants derived from jabuticabeira seedlings kept in a greenhouse, were washed with water and inoculated in MS medium with PVP (0, 0.5, 1.0, or 2.0) combined with different percentages of activated charcoal (0, 2 or 4%). After 30, 45 and 60 days were evaluated the presence or absence of oxidation of explants. The experimental design was factorial 4 PVP x 3 activated charcoal with 15 repetitions each treatment. For callus induction, explants were inoculated in MS medium with different combinations of 2,4-D and BAP regulators and the experimental design was factorial 4 2,4-D x 3 BAP with 20 repetitions each treatment. For callus formation with NAA and BAP, explants were inoculated in MS medium with different combinations of regulators and the experimental design was factorial 4 NAA x 3 BAP with 20 repetitions each treatment. The normal data were submitted to analysis of variance and the averages were compared by Tukey test at 5% significance level or compared using generalized linear models by Kruskal-Wallis test at 5% using the Assistat software. For anatomical reviews, calluses derived from the 2,4-D experiment and BAP were collected, fixed and prepared on histological blades. Based on the results, the concentration of 2% of combined active charcoal with 2.0 mg.L⁻¹ of PVP to control oxidation is indicated. To obtain callus is indicated inoculate only on MS medium without the addition of growth regulator. After anatomical assessment, the balance suitable for cultivation of callus with morphogenetic potential was treatment with 1.0 mg.L⁻¹ 2,4-D and 0.1 mg L⁻¹ BAP.

Keywords: jabuticaba, callus induction, antioxidant, oxidation

4.1. INTRODUÇÃO

Plinia cauliflora (Mart.) Kausel), pertencente a família Myrtaceae, é popularmente conhecida como jabuticabeira e possui importância econômica e medicinal. Seus frutos são muito apreciados pela população brasileira, podendo ser consumidos tanto *in natura* ou na forma de sucos, geleias, doces, picolés e licores (DANNER et al., 2007; BORTOLOTTI et al., 2015).

As sementes de jabuticabeira são sensíveis à perda de água, não sendo capazes de manter alta viabilidade quando armazenadas, independente da temperatura de armazenamento, o que lhes confere um caráter recalcitrante (VALIO; FERREIRA, 1992).

As possibilidades de uso das técnicas da cultura de tecidos vêm sendo utilizadas para a propagação de espécies recalcitrantes e tem apresentado resultados satisfatórios e propiciando a propagação em larga escala de várias frutíferas (PINHAL et al., 2011). Por se tratar de um ambiente onde o pesquisador tem total controle sobre o ambiente, a cultura de tecidos permite a propagação de espécies durante todo o ano, solucionando problemas como a de espécies consideradas recalcitrantes.

As plantas possuem totipotência e alta plasticidade em seu desenvolvimento, e é protagonizada, em última análise, por pequenos grupos celulares - os meristemas -, que funcionam como verdadeiras fontes de células mantenedoras de características juvenis e com alto potencial para diferenciação em diversos tecidos especializados durante o desenvolvimento pós embrionário das plantas (DINNENY; BENFEY, 2008).

Estudos com calos são importantes para determinar as condições de cultura que os explantes requerem para sobreviver e desenvolver (SIQUEIRA; INOUE, 1992). O cultivo de calos pode ser utilizado para se avaliar o desenvolvimento celular, explorar produtos resultantes do metabolismo primário e secundário, obter suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA, 2000).

Uma das grandes limitações da cultura de tecidos consiste na necessidade de um exato ajuste no balanço de nutrientes, reguladores de crescimento e condições de cultura em função de cada cultivar e do estado fisiológico das plantas (ARORA; SINGH, 1978).

O estudo anatômico dos calos é muito importante, pois assim é possível identificar células que possuem características de potencial organogênico ou embriogênico, e de acordo com Stein et al., (2010), células de calos com este potencial possuem alta divisão celular, são pequenas e isodiamétricas, citoplasma denso, núcleo volumoso com nucléolo proeminente e vacúolo pequeno.

Em razão dessa importância ecológica e comercial, o cultivo *in vitro* busca aprimorar a propagação da espécie, melhorando a multiplicação sexuada e assexuada de mudas em quantidade e menor período de tempo do que campo, pois, de acordo com Echeverrigaray et al., (2001), a aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem como principais vantagens o aumento rápido do número de indivíduos e a possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade.

Além disso, atualmente a cultura de tecidos tem se mostrado uma ferramenta de biotecnologia importante para fornecer informações no estudo da morfogênese tanto a nível molecular, como fisiológico e bioquímico permitindo ainda a compreensão da citodiferenciação, principalmente organogênese e embriogênese somática (THORPE, 2012).

A indução morfogênica depende de uma série de fatores, entre os quais está a fonte de carboidratos, de aminoácidos, de sais e de um balanço hormonal indutivo (EMONS, 1994). Além disso, Muitos estudos têm revelado um papel fundamental na aplicação de auxinas exógenas, principalmente 2,4-D, considerado uns dos principais indutores para a embriogênese somática (REIS et al., 2007).

Estratégia para aperfeiçoar a produção comercial da espécie é de muita importância, visto que o longo período de juvenildade acaba dificultando o seu cultivo e exploração, ainda, a maior parte das jabuticabeiras são cultivadas por pequenos agricultores e a produção nacional da fruta geralmente é vendida em feiras e por ambulantes.

4.2. OBJETIVO

Objetivou-se com este trabalho definir o melhor antioxidante, promover a indução de calos e analisar anatomicamente os calos provenientes de explantes foliares de jabuticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel).

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.4. Oxidação de explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) em diferentes concentrações de PVP e carvão ativado

Explantes foliares oriundos de plântulas de jabuticabeira com 5 meses mantidas em casa-de-vegetação foram coletados e lavados em água corrente com sabão neutro por mais ou menos 1 minuto.

Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as folhas foram imersas em álcool 70% por 3 minutos e em seguida, transferidas para NaClO (2,5%) por 20 minutos e posteriormente realizada a tríplice lavagem com água destilada e autoclavada.

As folhas foram cortadas em quadrados de aproximadamente 1 cm e inoculadas em tubos de ensaio com aproximadamente 15 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a face abaxial voltada para o meio de cultura, acrescido de 7g.L^{-1} de ágar, 1 mg.L^{-1} de 2,4-D e diferentes concentrações de Polivinilpirrolidona - PVP (0; 0,5; 1,0; e 2) combinado com C.A. (Carvão ativado) nas concentrações 0; 2 e 4%. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/8 horas (claro, escuro), temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiância de fóton de $43\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Após 30, 45 e 60 dias foram avaliados a presença ou ausência de oxidação dos explantes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 4×3 e 15 repetições cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% utilizando-se o software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2015).

4.4.1. Indução de Calogênese em folhas de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) com 2,4 – D e BAP

Explantos foliares oriundos plântulas de jabuticabeira com 5 meses mantidas em casa-de-vegetação foram coletados e lavados em água corrente com sabão neutro por mais ou menos 1 minuto.

Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as folhas foram imersas em álcool 70% por 3 minutos e em seguida, transferidas para NaClO (2,5%) por 20 minutos e posteriormente realizada a tríplice lavagem com água destilada e autoclavada.

As folhas foram cortadas em quadrados de aproximadamente 1 cm e inoculadas em tubos de ensaio com aproximadamente 15 ml de meio de cultura utilizado foi o MS, com a face abaxial voltada para o meio de cultura, suplementado com 2,4-D (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 0,1; 0,2 mg.L⁻¹) em todas as combinações possíveis, 7 g.L⁻¹ de ágar, 1 g.L⁻¹ de Polivinilpirrolidona e pH ajustado a 5,8 e autoclavado a 121° C por 20 minutos.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25 ± 2 °C e irradiância de fóton de 43 μmol m⁻²s⁻¹.

Após 30, 45 e 60 dias foram avaliados a presença ou ausência de calos na base do explante.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 4 x 3 e 20 repetições cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% utilizando-se o software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2015).

4.4.2. Indução de calogênese em folhas de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) com ANA e BAP

Explantos foliares oriundos plântulas de jabuticabeira com 8 meses mantidas em casa-de-vegetação foram coletados e lavados em água corrente com sabão neutro por mais ou menos 1 minuto.

Em seguida, em câmara de fluxo laminar foram imersas em álcool 70% por 3 minutos e posteriormente, transferidas para NaClO (2,5%) por 20 minutos onde foi realizada a tríplice lavagem com água destilada e autoclavada.

As folhas foram cortadas em quadrados de aproximadamente 1 cm³ e inoculadas em tubos de ensaio com aproximadamente 15 ml de meio de cultura utilizando-se o MS, suplementado com ANA (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹). O meio de cultura foi acrescido de 7g/L⁻¹ de ágar, 2 g.L⁻¹ de PVP + 2% carvão ativado e o pH ajustado a 5,8 e autoclavado a 121° C por 20 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25 ± 2 °C e irradiância de fóton de 43 μmol m⁻²s⁻¹.

Após 30, 45 e 60 dias foram avaliados a presença de calos na base do explante.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 4 x 3 e 15 repetições cada tratamento. Os dados normais foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% utilizando-se o software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2015).

4.4.3. Análises anatômicas de calos de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel)

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Farmacobotânica e Plantas Medicinais da Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Centro-Oeste.

Foram realizadas com calos provenientes de 15 tratamentos utilizando 2,4-D e BAP, de acordo com a Tabela 5:

Tabela 5 - Tratamentos utilizando balanço hormonal com os reguladores de crescimento 2,4-D e BAP em explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*)

Tratamento	2,4-D (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)
1	0,0	0,0
2	0,0	0,1
3	0,0	0,2
4	1,0	0,0
5	1,0	0,1
6	1,0	0,2
7	2,0	0,0
8	2,0	0,1
9	2,0	0,2
10	4,0	0,0
11	4,0	0,1
12	4,0	0,2
13	8,0	0,0
14	8,0	0,1
15	8,0	0,2

As amostras foram desidratadas em série etílica crescente (70%, 80%, 90% e 100%) por uma hora em cada concentração e duas vezes de 1 hora na concentração de 100%, posteriormente ficaram *over night* em álcool + resina (50%). Então as amostras foram colocadas em resina 100% durante 48 horas e depois emblocados em resina Leica de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram seccionadas com espessura de 5 µm em micrótomo rotativo e coradas com Azul de toluidina 0,05% e solução de lugol fraca, sendo as lâminas visualizadas em microscópio fotônico Zeiss Scope A1, acoplado com câmera.

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. Oxidação de explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) em diferentes concentrações de PVP e carvão ativado

Os explantes inoculados nos meios de cultivo sem PVP e sem carvão apresentaram maior taxa oxidação, junto com o tratamento usando 0 de carvão e 2,0 mg.L⁻¹ de PVP, resultado similar com o de Sartor et al., (2013), avaliando *Dalbergia nigra* e mostrou que a presença apenas de PVP no meio de cultura não diminuiu a oxidação dos explantes (Tabela 6).

Tabela 6 – Dados médios da oxidação e formação de calos em explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) cultivados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de PVP e carvão ativado aos 30 e 45 dias

Carvão %	PVP g.L ⁻¹	% de oxidação 30 dias	% de oxidação 45 dias	% formação de calos
0	0,0	33,3 b	33,3 b	0,0 b
	0,5	0,0 a	0,0 a	0,0 b
	1,0	8,3 a	8,3 a	0,0 b
	2,0	33,3 b	33,3 b	0,0 b
2	0,0	0,0 a	0,0 a	0,0 b
	0,5	8,3 a	8,3 a	0,0 b
	1,0	0,0 a	0,0 a	8,3 b
	2,0	0,0 a	0,0 a	0,0 b
4	0,0	0,0 a	0,0 a	5,0 b
	0,5	0,0 a	0,0 a	0,0 b
	1,0	8,3 a	8,3 a	0,0 b
	2,0	8,3 a	16,6 a	0,0 b

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados mostraram que para diminuir a oxidação de jabuticabeira pode ser usado tanto o PVP ou carvão de forma isolada, já que os tratamentos que utilizaram apenas um dos dois antioxidantes, também não teve diferença estatística para os demais, isso diminui os custos para a propagação *in vitro* da espécie.

No entanto, para os tratamentos utilizando 2% de carvão e 1,0 mg.L⁻¹ de PVP e 4% de carvão e 0,0 mg.L⁻¹ de PVP, além de não haver oxidação, foi verificado a presença de calos na base de alguns explantes.

Alguns gêneros de plantas são mais suscetíveis à oxidação que outros. As plantas da família Myrtaceae, como a maioria das plantas lenhosas, são ricas em compostos fenólicos, e estes compostos dificultam o estabelecimento inicial

do cultivo *in vitro* (SOUZA et al., 2011).

O PVP é bastante empregado em propagação vegetativa tanto de jabuticabeira quanto para a família Myrtaceae (SOSPEDRA et al., 2003; PEREIRA et al., 2005; MOTOIKE et al., 2007; SASSO; CITADIN; DANNER, 2010), na tentativa de diminuir a oxidação. Além disso, absorve também os fenóis, por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica, ou seja, as quinonas (MÔNACO et al., 1977).

Pinheiro et al., (2013) estudando duas cultivares 'Arbequina' e 'Maria da Fé' (*Olea europaea*/Oleraceae) constataram alta taxa de oxidação em segmentos nodais cultivados com 0,2 mg.L⁻¹ de PVP e concluíram que aumentando a taxa de antioxidante, diminui-se a taxa de oxidação. Ainda, afirmam que as plantas lenhosas, incluindo a maioria das plantas frutíferas, apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro* em razão, principalmente, da oxidação e contaminação dos explantes, no entanto, para a jabuticabeira, tanto a presença de PVP quanto de carvão conseguiram diminuir a taxa de oxidação, exceto para o tratamento controle e para a de 2,0 mg.L⁻¹ de PVP.

O carvão ativado promove a adsorção dos produtos liberados pelo explante durante a excisão e que provocam a oxidação, além disso, adsorve e reduz a disponibilidade de auxina exógena no meio de cultura (RIBEIRO et al., 2000; CHAGAS et al., 2005), e isso pode ter contribuído para a baixa formação de calos.

A imersão de segmentos nodais de *Myrciaria dubia* (Myrtaceae) em 2mg.L⁻¹ de PVP no meio de cultura MS se mostrou eficiente para evitar a oxidação dos explantes (CÓRDOVA et al., 2014), resultado diferente ao encontrado nesse trabalho, onde essa concentração obteve maior taxa de oxidação em comparação as demais.

Trabalhando com *Eugenia involucrata* (Myrtaceae), Golle e Reiniger (2013), verificaram oxidação mesmo utilizando 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, no entanto, os processos oxidativos não inviabilizaram o estabelecimento e desenvolvimento da espécie, concordando com os resultados encontrados neste trabalho para o tratamento com 4% de carvão ativado e 0,0 mg.L⁻¹ de PVP, onde houve desenvolvimento de alguns calos.

4.5.2. Calogênese em folhas de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) com 2,4- D e BAP

Todos os tratamentos apresentaram formação de calos aos 45 e 60 dias, no entanto, poucas repetições, não havendo diferença estatística entre eles (Tabela 7).

Tabela 7 - Indução de calos em explantes foliares de jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) com 2,4-D e BAP aos 45 e 60 dias

2,4-D mg.L ⁻¹	BAP mg.L ⁻¹	% calos 45 dias	% calos 60 dias
0	0,0	0,0 a	1,3 a
	0,1	0,0 a	2,0 a
	0,2	0,0 a	5,0 a
1	0,0	0,0 a	0,5 a
	0,1	1,25 a	6,8 a
	0,2	2,25 a	8,7 a
2	0,0	0,0 a	4,0 a
	0,1	0,5 a	9,75 a
	0,2	3,5 a	10,1 a
4	0,0	0,0 a	0,25 a
	0,1	0,0 a	0,0 a
	0,2	0,5 a	6,0 a

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

Todos os calos formados tinham aspecto compacto e coloração verde aos 60 dias. Yeoman (1970), considera que o crescimento de calo em diferentes espécies e tecidos pode ser: independente de auxina e citocinina, dependente de auxina, dependente de citocinina ou dependente de ambas, auxina e citocinina. Os resultados desse trabalho mostram que a calogênese em jabuticabeira pode ocorrer independente de auxina e citocinina exógena, uma vez que houve baixa formação de calos mesmo no tratamento controle.

A maior parte dos trabalhos relata que a formação de calos é facilmente obtida principalmente através do uso de 2,4-D (AMMIRATO, 1983; ALMEIDA et al., 2015; REIS et al., 2007; CARVALHO et al., 2015), no entanto, para explantes foliares de jabuticabeira esta auxina não demonstrou resultados satisfatórios, uma vez que houve baixa formação de calos com esse regulador.

Cangahuala-Inocente (2007), obteve 100% de calos com a combinação

de 2,4-D e BAP em filetes de *Acca selowiana*, porém, a utilização apenas de BAP inibiu a formação de calos, resultado diferente ao encontrado nesse trabalho, onde a máxima porcentagem de calos chegou a 10,1%.

Vários fatores influenciam o comportamento do explante no meio de cultura, como por exemplo, o órgão que serve como fonte de tecido, a idade fisiológica e ontogenética do órgão, o tamanho do explante e acima de tudo a qualidade da planta doadora (THORPE; PATEL, 1984).

A baixa formação de calos (Tabela 8) pode ser, de acordo com Moore (1985), devido aos explantes terem sido coletados numa fase em que o balanço hormonal endógeno era desfavorável à formação de calos.

Em trabalho publicado por Golle e Reiniger (2013), estudando cerejeira do mato (Myrtaceae), além da associação dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP na concentração de 5-10 μ M ter sido mais promissora para a obtenção de calos embriogênicos, a melhor forma de inoculação para obtenção de diferentes tipos de calos para a espécie foi com a folha na posição abaxial em contato com o meio e sem cortes no limbo foliar. Neste trabalho, os explantes de jabuticabeira foram inoculados na posição abaxial, no entanto, foram realizados cortes no limbo foliar.

4.5.3. Calogênese em folhas de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) com ANA e BAP

Os tratamentos utilizando 0,0 mg.L⁻¹ de ANA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP/ 2,0 mg.L⁻¹ de ANA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP obteve poucos calos, mas a maior parte dos tratamentos não obteve calos até a última avaliação aos 60 dias (Tabela 8).

Tabela 8 - Indução de calos em explantes foliares de jaboticabeira (*Plinia cauliflora*) com ANA e BAP, aos 60 dias

ANA mg.L ⁻¹	BAP mg.L ⁻¹	% Calos 60 dias
0,0	0,0	67,50 b
	1,0	67,50 b
	2,0	103,75 a
1,0	0,0	67,50 b
	1,0	73,33 b
	2,0	67,50 b
2,0	0,0	67,50 b
	1,0	85,41 ab
	2,0	67,50 b
4,0	0,0	67,50 b
	1,0	67,50 b
	2,0	67,50 b

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar da baixa formação de calos em todos os experimentos, o que se utilizou 2,4-D e BAP apresentou melhores resultados, pois em todos os tratamentos foi encontrado calos, enquanto com ANA e BAP apenas dois tratamentos obtiveram calos. O meio de cultura acrescido de citocinina tem sido registrado por muitos autores como um indutor de maior resposta morfogênica *in vitro*, de acordo com Almeida et al., (2015), no entanto, comparando com os resultados desse trabalho, o uso isolado com 0,0 mg.L⁻¹ de ANA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP obteve poucos calos, assim como combinado com 2,0 mg.L⁻¹ de ANA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, ainda, as demais combinações não obtiveram calos.

Uma das formas de obter sucesso no estabelecimento *in vitro* de uma espécie é o estado nutricional da planta doadora, para isso ela tem que estar bem nutrida e sadia (MONFORT, 2014). É aceitável que, como todos os tratamentos continham carvão ativado, ele pode ter inibido a formação de calos, pois de acordo com Werner et al., (2009), o carvão ativado tem efeito adsorvente, imobilizando parte dos elementos que compõem o meio de cultura, inclusive os fitorreguladores.

Afonso et al., (2015), estudando multiplicação *in vitro* de *Psidium*

Cattleianum sabine Var. *Humile* (Myrtaceae) observou a formação de calos em meio de cultura suplementado com ANA, porém, nesse estudo não foi observado o mesmo, pois os tratamentos usando apenas ANA não obtiveram calos.

Ribeiro (2012), estudando *Eucalyptus grandis* (Myrtaceae), não observou formação de calos nos tratamentos sem suplementação de reguladores de crescimento, e os tratamentos com maior proliferação de calos foram os meios que incluíam concentrações de ANA entre os 0,5 e 3 mg.L⁻¹, discordando dos resultados obtidos nesse trabalho.

Todos os explantes foliares de jabuticabeira se encontraram oxidados ao fim do experimento aos 60 dias (Tabela 9) mesmo com a presença de PVP e carvão ativado no meio de cultura.

Tabela 9 - Oxidação de explantes foliares de jabuticabeira (*Plinia cauliflora*) inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de ANA e BAP, aos 30 e 60 dias

ANA mg.L ⁻¹	BAP mg.L ⁻¹	% Oxidação 30 dias	% Oxidação 60 dias
0,0	0,0	46 a	57 a
	1,0	70 a	75 a
	2,0	46 a	69 a
1,0	0,0	46 a	69 a
	1,0	57 a	58 a
	2,0	51 a	82 a
2,0	0,0	46 a	57 a
	1,0	69 a	82 a
	2,0	45 a	62 a
4,0	0,0	52 a	63 a
	1,0	57 a	82 a
	2,0	52 a	63 a

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

Ledo, Lameira e Benbadis (2002), relataram o aumento no índice de fenóis devido às injúrias, e Golle e Reiniger (2013), estudando cerejeira do mato (Myrtaceae), concluiu que houve redução nas taxas oxidativas dos explantes sem cortes quando se utilizou o fitorregulador ANA. As injurias causadas pela retirada das bordas foliares nesse experimento, pode ter refletido na oxidação fenólica, possivelmente como resposta celular ao estresse causado, já que, de acordo com Nakazawa et al., (2001), ferimentos estimulam a atividade da enzima fenilalanina amonia-liase (PAL). Portanto, sugere-se inocular os explantes de

jabuticabeira sem cortes no limbo foliar.

Bassan et al., (2006), explicaram que a presença de compostos fenólicos pode ter uma conexão com processos de regulação de crescimento, os quais, dependendo da concentração endógena no tecido, induzem à síntese dos compostos. Isso pode dizer muito sobre a alta taxa de oxidação, talvez os níveis desses reguladores estivessem completos, e a adição dos mesmos, no meio de cultura, trouxe um desequilíbrio para os processos de crescimento.

4.5.4. Análises Anatômicas de calos de explantes foliares de Jabuticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel)

A capacidade de regeneração *in vitro* resulta na interação de alguns fatores, como o processo de indução, competência celular, determinação e diferenciação celular, resultando na obtenção de órgãos (organogênese) ou embriões somáticos (embriogênese) (ALMEIDA et al., 2015).

Respostas morfogênicas são geralmente caracterizados por células de pequeno tamanho, grande núcleo com nucléolo proeminente e citoplasma denso, enquanto que os não embriogênicos geralmente possuem formato alongado das células, núcleo pequeno, citoplasma não denso e grande vacúolo (PINTO et al., (2011).

Os explantes foliares inoculados nos tratamentos com 2,4-D e BAP foram analisados quanto às características anatômicas (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8). Os explantes inoculados nos meios de cultura MS suplementados com 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e diferentes concentração de BAP apresentaram diferenças anatômicas relacionadas com as adição de BAP. No controle, 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e BAP (Figura 4 A e B) os explantes não apresentaram desdiferenciação celular, sendo identificado o parênquima paliçádico, além de acúmulo de grão de amido (Figura 4 B).

Os explantes foliares inoculados em 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP (Figura 4 C e D) apresentaram desdiferenciação celular, com células pequenas, isodiamétricas e regiões de divisão celular (Figura 4 C) com acúmulo de grão de amido (Figura 4 D) características de calos com potencial morfogênico e também corroborando resultados encontrados por Carvalho *et al.*, (2015), caracterizando calos de explantes foliares de *Passiflora gibertii* utilizando 2,4-D e cinetina. Os

explantes cultivados em $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (Figura 4 E e F) apresentaram células desdiferenciadas, envoltas por células maiores e intensamente vacuolizadas (Figura 4 E) com pouco acúmulo de grãos de amido (Figura 4 F), característico de calos não morfogênicos.

Os calos induzidos com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e diferentes concentrações de BAP apresentaram maior desdiferenciação (Figura 5). Na anatomia dos calos induzidos em $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP pode-se observar células pequenas, isodiamétricas, com parede celular delgada, no entanto, com muitos espaços intercelulares (Figura 5 A) e pouco acúmulo de grão de amido (Figura 5 B). Os grãos de amido, de acordo com Torres (2013), indicam alta atividade energética, e são utilizados para iniciar e manter o desenvolvimento dos calos, além disso, são importantes para aquisição de competência embriogênica, estando presentes principalmente em células com características meristemáticas.

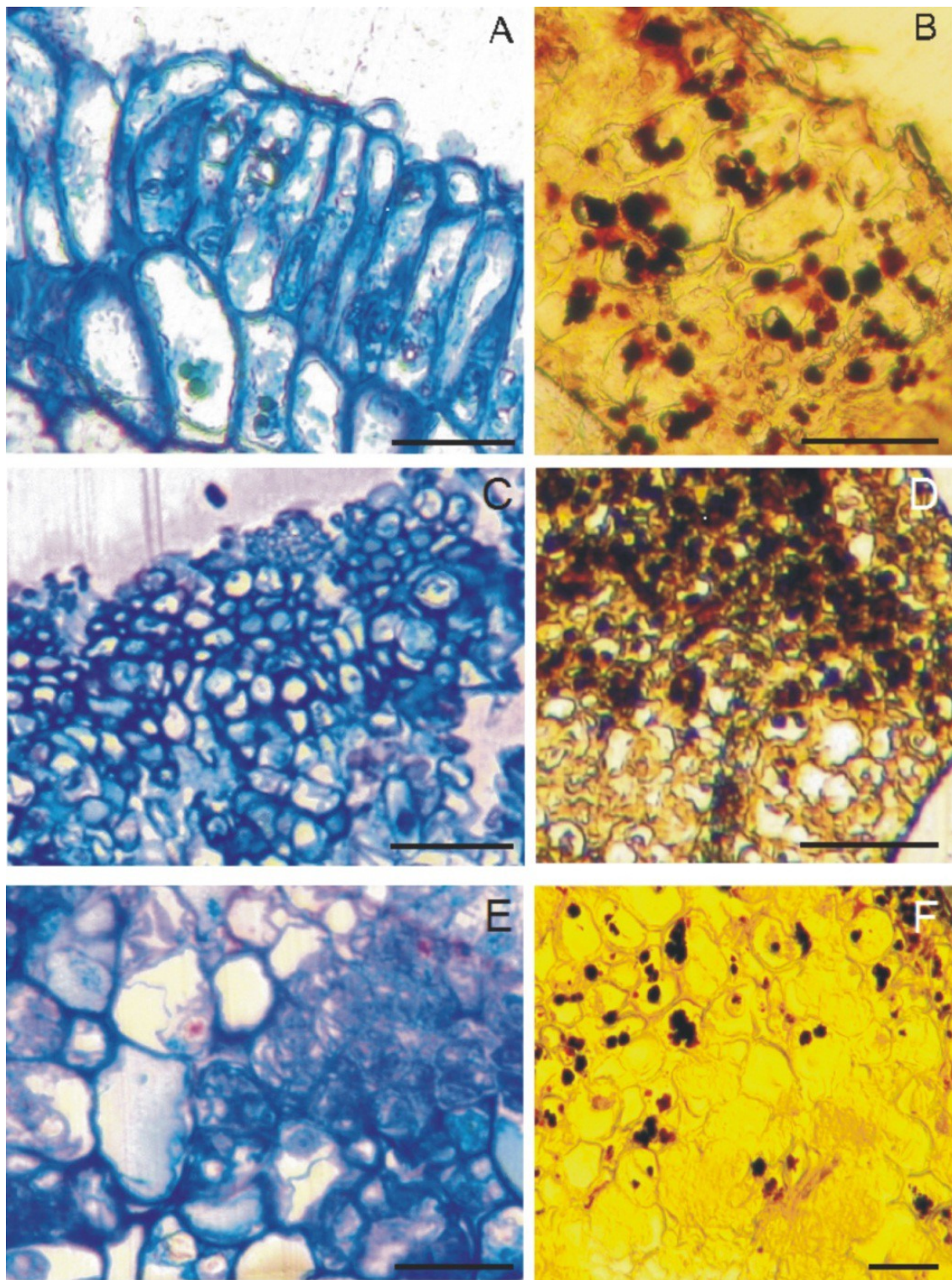


Figura 4 - Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jaboticabeira (*Plinia cauliflora*). A, B- 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP; aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) e (B) Parênquima paliçádico da folha, sem desdiferenciação de tecidos. (C) células em divisão celular, e (D) grande quantidade de grãos de amido. (E) e células vacuolizadas, desorganizadas e (F) poucos grãos de amido.

Além disso, os explantes inoculados em $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP apresentaram células pequenas, isodiamétricas, com parede celular delgada e organizadas em pequenos grupos (Figura 5 C e D). Por outro lado, os calos formados em $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP apresentaram células vacuolizadas, parede celular espessa, espaços intercelulares (Figura 5 E) e grãos de amido (Figura 5 F).

O aumento da concentração de 2,4-D para $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ combinado com diferentes concentrações de BAP observou-se menor desdiferenciação celular e maior desorganização das divisões celulares. Os explantes inoculados em $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP apresentaram regiões com células pequenas e em intensa divisão celular e na periferia celular mais alongadas (Figura 6 A). As células cultivadas em $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP estão dispostas de forma desorganizada e apresentam muitos espaços intercelulares, assim com as células do tratamento com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, são alongadas, dispostas de forma desorganizada e também possuem muitos espaços intercelulares (Figura 6 E) sem presença de reserva energética (Figura 6 F).

Os calos induzidos em $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP apresentaram regiões de grupos de células pequenas (Figura 7 A) e acúmulo de grão de amido (Figura 7 B) rodeada por células mais alongadas e desorganizadas. Já os tratamentos de $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D combinados com BAP apresentaram pouca desdiferenciação (Figura 7 C e E).

Nos tratamentos com $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D (Figura 8), apenas o tratamento com adição de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP apresentou calos formados internamente por células pequenas e em divisão celular organizada, rodeadas por células desorganizadas (Figura 8 F) e sem acúmulo de grãos de amido.

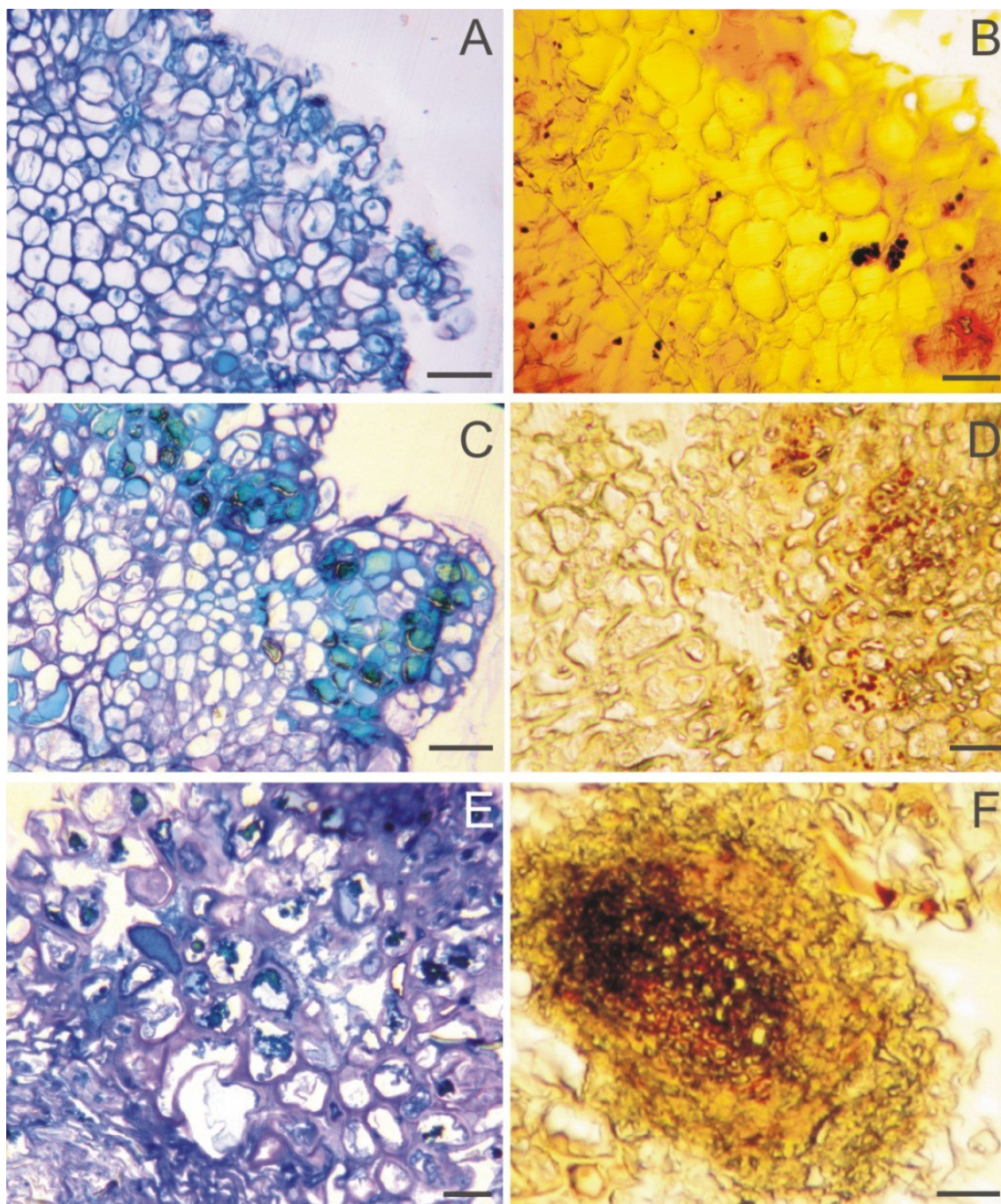


Figura 5 - Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jaboticabeira (*Plinia cauliflora*) com A, B- 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP; aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) células com parede celular delgada e algumas regiões com divisão celular e na periferia do calo muitos espaços intercelulares, (B) pouco grão de amido. (C) e (D) células com parede celular delgada, divisão celular formando regiões globulares organizadas. (E) e células vacuolizadas, parede celular espessa e espaço intercelulares (F) com acúmulo de grão de amido.

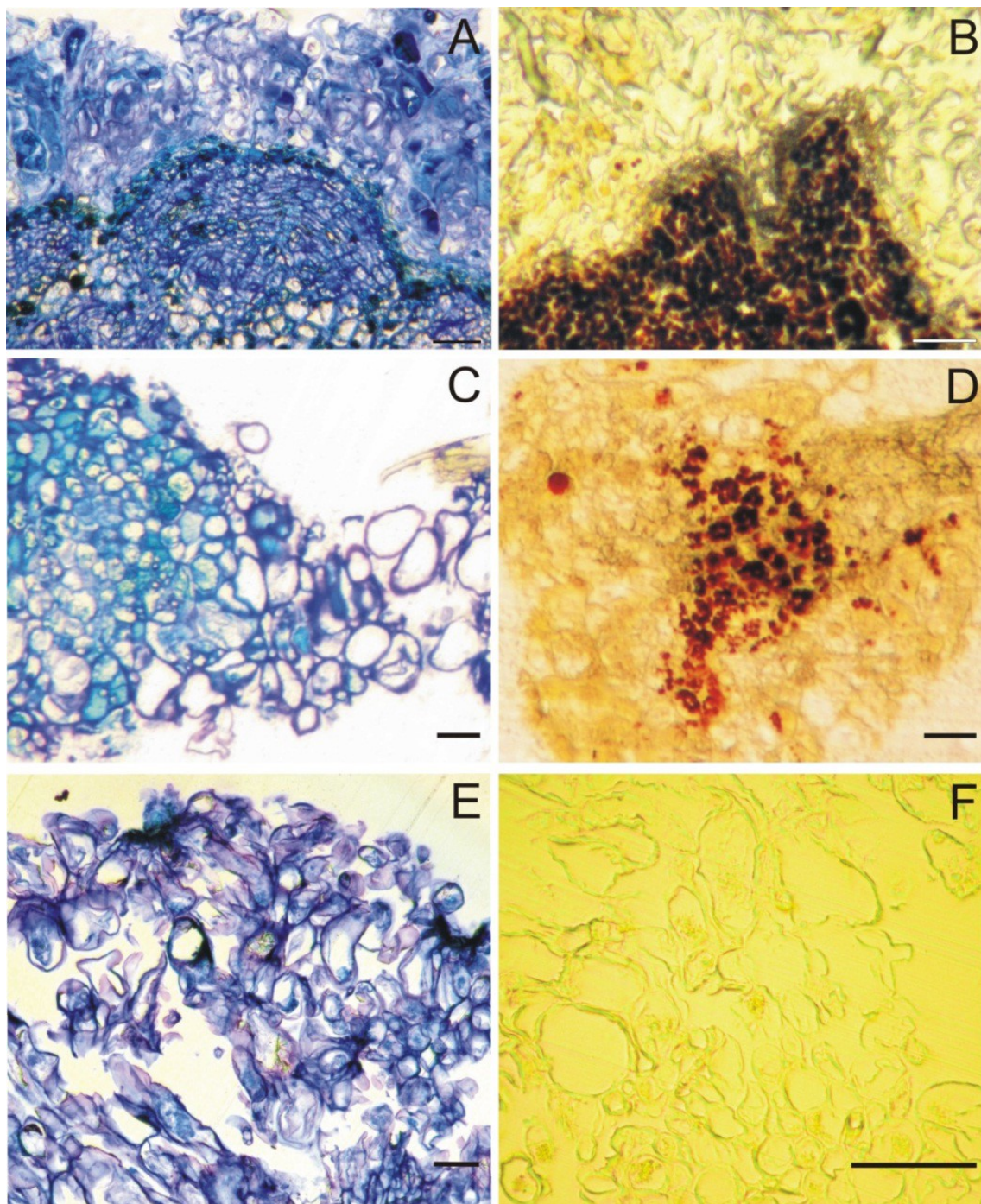


Figura 6 - Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jaboticabeira (*Plinia cauliflora*) com A, B- 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP; aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) células internas pequenas, com parede celular delgada em região de intensas divisões celulares e células na periferia do calo com muitos espaços intercelulares e (B) grãos de amido. (C) e (D) pouca desdiferenciação celular e muitos espaços intercelulares (E) e (F) células alongadas com muitos espaços intercelulares e (F) sem acúmulo de grãos de amido.

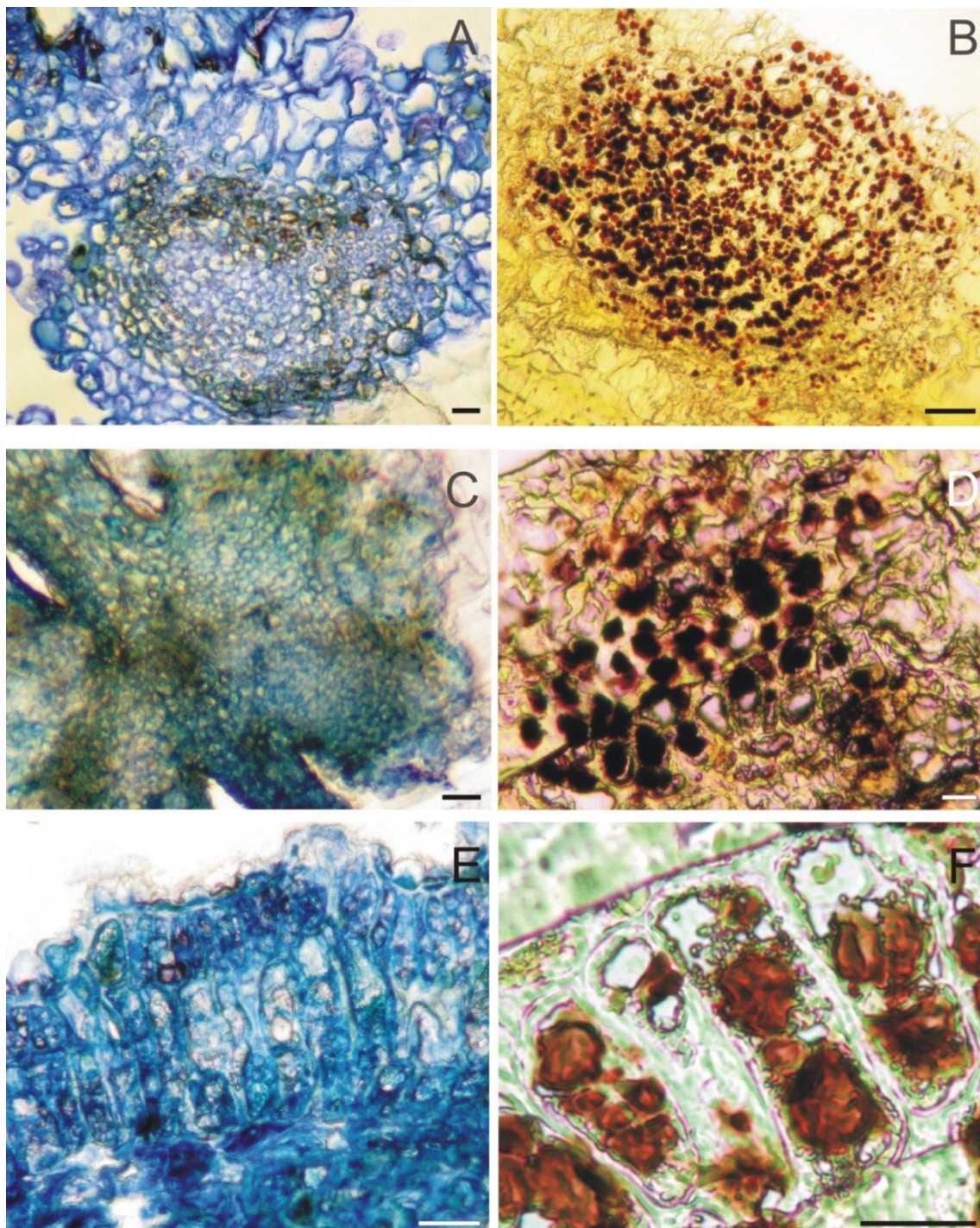


Figura 7 - Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jaboticabeira (*Plinia cauliflora*) com A, B- 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP; aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) Células pequenas em organização globular e periferia com células alongada e com espaços intercelulares (B) acumulo de grãos de amido (C) e (D) pouca desdiferenciação (E) e parênquima paliçádico (F) com grão de amido.

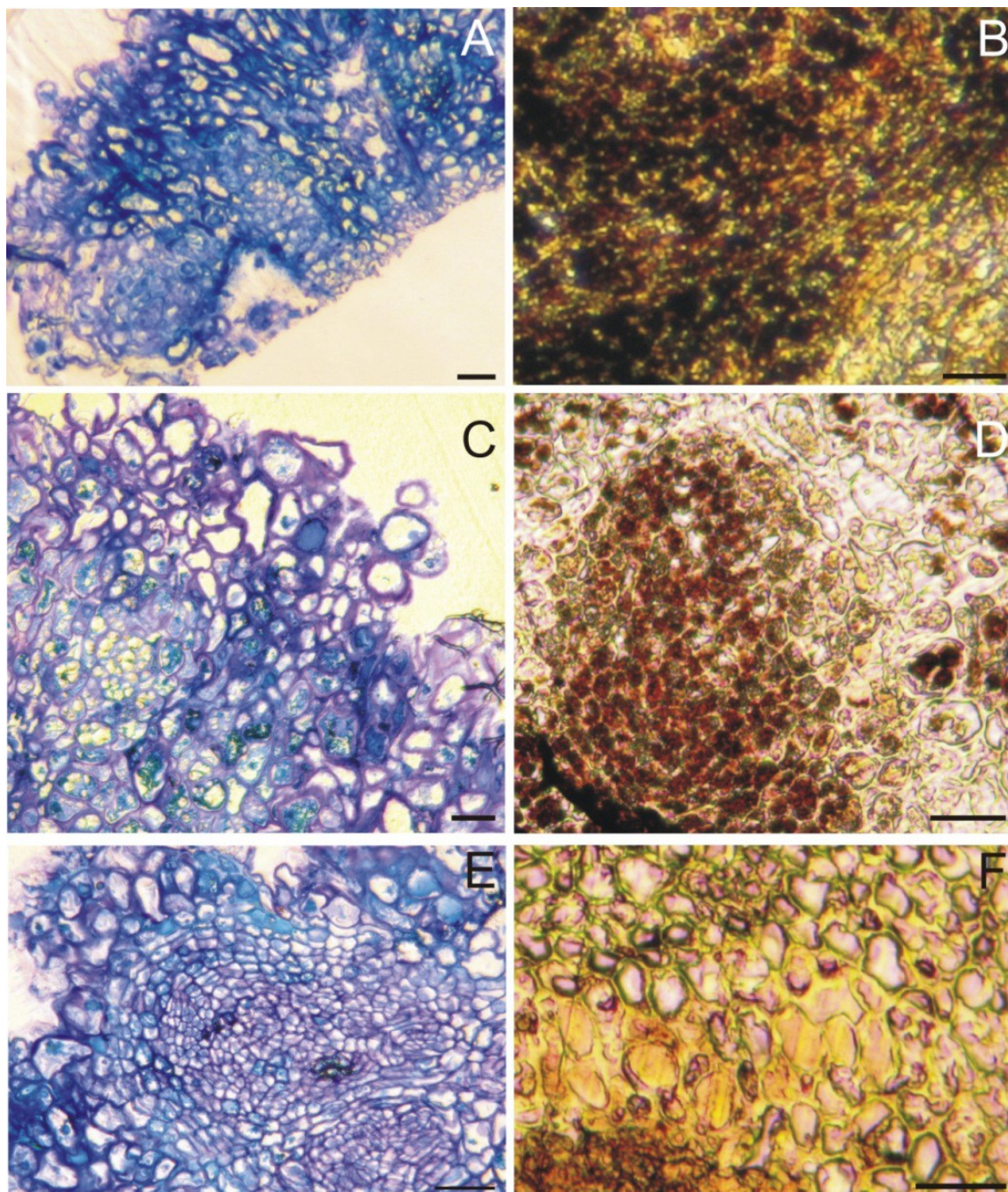


Figura 8 - Análise anatômica de calos induzidos em explantes foliares de Jaboticabeira (*Plinia cauliflora*) com A, B- 8,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP; C, D- 8,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ BAP; E, F- 8,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP aos 60 dias após a inoculação – A, C, E calos corados com Safranina; B, D, F calos corados com Lugol. (A) desdiferenciação desorganizada das células e (B) grande acúmulo de grão de amido (C) e (D) células com parede espessa e pouca organização celular (D) acúmulo de grão de amido (e) região interna do calo com células pequenas e em divisão células rodeadas por células desorganizadas (F) e sem acúmulo de grãos de amido.

Os calos com potencial morfogênico são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002) (Figura 5 A e B).

Durante a cultura de embriões somáticos, as células armazenam grande quantidade de grãos de amido, sugerindo que os grãos de amido podem ser utilizados como indicativos iniciais do potencial embriogênico (GODBOLE et al., 2004; APPEZZATO DA-GLÓRIA; MACHADO, 2004). Aos 60 dias os calos dos tratamentos com: 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e BAP; 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ de BAP (Figura 4 A,B,C e D)/ 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP (Figura 5 E e F)/ 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 de BAP (Figura 6 A)/4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 de BAP (Figura 7 A e B) ainda estavam em constante metabolismo celular, indicativo gerado pela presença de grãos de amido quando coradas com lugol.

A análise ultraestrutural de *Campomanesia adamantium* Camb., (Gabirobeira, Myrtaceae) permitiu inferir que os calos induzidos com 1,0 mg.L⁻¹ de picloram em segmentos nodais apresentam potencial morfogênico aos 14 e aos 28 dias após a inoculação (ROSSATO, 2015).

No presente trabalho não houve diferença entre os diferentes balanços hormonais de 2,4-D e BAP para a indução de calos em explantes foliares de jabuticabeira (Tabela 7). No entanto, a partir da avaliação anatômica, os melhores tratamentos para a obtenção de calos com potencial regenerativo foram os: 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ de BAP (Figura 5 C)/ 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de BAP (Figura 7 A)/ 8,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP (Figura 8 E) pois apresentaram bastante células em divisão celular, parede celular delgada, espaços intercelulares e células com características meristemáticas.

Além disso, as células apresentaram coloração translúcido-amareladas, característica de calos friáveis e com potencial para formar embriões somáticos, corroborando afirmação feita em estudos de (GUERRA et al., 1999; IPEKCI; GOZUKIRMIZI, 2005; ARUNYANART; CHAITRAYAGUN, 2005).

Em espécies de interesse medicinal, o cultivo de calos tem sido uma alternativa viável e amplamente utilizada. A técnica pode ser utilizada na morfogênese e regeneração indireta, em estudos de desenvolvimento e diferenciação celular e na exploração de produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, tanto em cultivo de órgãos isolados, quanto a partir do estabelecimento de suspensões celulares (VANISREE et al., 2004).

5. CONCLUSÃO

Nas condições observadas nesse trabalho, são indicadas as concentrações de 2% de carvão ativo combinado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PVP e 4% de carvão ativo combinado com $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de PVP, no entanto, ainda são necessários mais estudos na tentativa de diminuir ainda mais as taxas de oxidação para a espécie.

Para a obtenção de calos em explantes foliares de jabuticabeira é indicado o uso apenas de meio MS sem a adição de fitorregulador.

Após avaliação anatômica dos explantes, os balanços que obtiveram calos com potencial regenerativo foram com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP/ $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP/ $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP – no entanto, como sempre buscamos minimizar os custos dentro do laboratório, o tratamento com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP é indicado para a indução de calos com potencial morfogênico em jabuticabeira pois utiliza menor quantidade de regulador.

6. REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. V.; BERNARDY, K.; BERNARDY, D.; PEREIRA, A. S.; DORNELES, A. O. S.; Multiplicação *in vitro* de araçá-vermelho (*Psidium Cattleianum sabine* Var. Humile) – Myrtaceae. **XX Jornada de Pesquisa**. Unijui. 2015.
- ALMEIDA, C. S.; SILVA, A. V. C.; ARAÚJO, A. G.; LÉDO, A. S.; Respostas morfogênicas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.28, n.1, p. 58-64. 2015.
- AMMIRATO, P. V.; Embryogenesis. In: EVANS D. A.; SHARP W. R.; AMMIRATO P. V.; YAMADA E. Y.; (Eds.). **Handbook of Plant Cell Culture**, New York, Macmillan Publisher. Co., p. 82 – 123. 1983.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; **Anatomia Vegetal**; Viçosa - Editora UFV, 438 p. 2013.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S. R.; Ultrastructural analysis off *in vitro* direto and indireto organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.27, n.3, p.429-437, 2004.
- ARORA, I. K.; SINGH, R. N.; Growth hormones and in vitro callus formation of papaya. **Scientia Horticulturae**, v.8, p.357-361, 1978.
- ARUNYANART, S.; CHAITRAYAGUN, M.; Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). **Scientia Horticulturae**, v.105, n.3, p.411-420, 2005.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLORES, A. V.; Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium*). **Ciência Florestal**, v.16, n.4, p.381-390, 2006.
- BORTOLOTO, I. M.; AMOROZO, M. C. M.; NETO, G. G.; OLDELAND, J.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A.; Knowledge and use of wild edible plants in rural communities along Paraguay river, Pantanal, Brazil. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**. v. 11, n. 1, p. 1, 2015.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P.; Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). Nota científica. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 87-89, 2007.
- CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; ALVES, E.; CASTRO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P.; Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Revista Ceres**. Viçosa, v. 62, n. 4, 2015.

CHAGAS, E. A., PASQUAL, M., RAMOS, J. D., PIO, L. A. S., DUTRA, L. F., CAZETTA, J. O.; Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, p. 1125-1131. 2005.

CÓRDOVA, A. M.; COBOS, M.; IMÁN, S. A.; CASTRO, J. C.; Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaughn "Camu Camu". **Scientia Agropecuaria**, v. 5, n. 1, p. 25-34, 2014.

DANNER, M. A; CITADIN, I.; JUNIOR, A. A. F.; 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**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1. p. 179-182, 2007.

DINNENY, J. R.; BENFEY, P. N.; Plant stem cell niches: standing the test of time. **Cell**, v. 132, Issue 4, p. 553–557, 2008.

EMONS, A.M.C.; Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, 43: 1-14. 1994.

GODBOLE, S.; SOOD, A.; SHARMA, M.; NAGAR, P.K.; AHUJA, P.S.; Starch deposition and amylase accumulation during somatic embryogenesis in bamboo (*Dendrocalamus hamiltonii*). **Journal of Plant Physiology**, v.161, p. 245-248, 2004.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; Fitorreguladores e posição de explantes foliares na indução à calogênese em cerejeira-do-mato. **Ciência Rural**. v. 43, n. 10, Santa Maria, 2013.

GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B.; Embriogênese somática e sementes sintéticas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, 1999.

IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N.; Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, n.3, p.341-345, 2005.

LANDA, F. S. L.; Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24 (Edição Especial), p.56-63, 2000.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p. 604-607, 2002.

MÔNACO, L. C.; SONDAHL, M. R.; CARVALHO, A.; COCROMO, O. J.; SHARP, W. R.; Applications of tissue culture in the improvement of coffee. **Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 1977.

MONFORT, L. E. F.; Micropropagação e aclimatização de *Ocimum selloi* Benth., uma planta medicinal. 2014.

MOORE, G. A.; Factors affecting in vitro embryogenesis from underveloped ovules of mature Citrus fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.110, p.66-70, 1985.

MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. C.; Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Volume 89, Issue 1, p. 75-81, 2007.

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

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H.; TAKEDA, G.; KUBO, H.; Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, v.114, p. 323-328, 2001.

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

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; Aplicações da cultura de tecidos vegetais em frutíferas do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7. p. 1136-1142, 2011.

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, v. 37, n. 1, p. 19-29, 2013.

PINTO, D. L. P.; ALMEIDA, A. M. R.; RÊGO, M. M.; SILVA, M. L.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C.; Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of comercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 521-530. 2011.

PINTO, D. L. P.; ALMEIDA, A. M. R.; RÊGO, M. M.; SILVA, M. L.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C.; Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of comercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 521-530, 2011.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; FUENTES-CERDA, C.F.J.; ROJAS-HERRERA, R.; LOYOLA-VARGAS, V.M.; Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.20, p.1141-1149, 2002.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C.; Efeito do 2,4-D na indução de calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. amazonicum (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 498-500, 2008.

RIBEIRO, S. R.; Regeneração e transformação em *Eucalyptus grandis*. Universidade de Lisboa. 2012.

RIBEIRO, V. G.; SANÁBIO, D.; DE SOUZA, C. N.; Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia osbeck* \times *Poncirus trifoliata* (L.) RAF1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, 35(1), 27-30, 2000.

ROSSATO, M.; Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos e ultraestruturais da calogênese em *Campomanesia adamantium*. Universidade Federal de Goiás. 2015.

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H.; Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

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

SILVA, F. A. S.; Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: **World congress on computers in agriculture**. p. 22-24, 2009.

SIQUEIRA, E. R.; INOUE, M. T.; Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.27, n.4, p.639-646, 1992.

SOSPEDRA, R. S.; LÓPEZ, M. G.; CRUZ, L. J.; LÓPEZ, G. G.; QUIÑONES, E. G.; Micropropagación de *Psidium Salutare* (Myrtaceae). **Revista del Jardin Botánico Nacional**. 24 (1-2): 245-250, 2003.

SOUZA, L. S.; FIOR, C. S.; SOUZA, P. V. D.; SCHWARZ, S. F.; Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33 n.3, Jaboticabal, 2011.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; VARGAS, D. P.; Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.53, n.2, p.159-163, 2010.

THORPE, T. A.; PATEL, K. R.; VASIL, I. K.; Clonal propagation: adventitious buds. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, v. 1, p. 49-60, 2012.

TORRES, L. F.; Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de *Coffea arábica*. Universidade Federal de Lavras, 2013.

TORRES, L. F.; Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de *Coffea arábica*. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Lavras, 111f. 2013.

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

WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. S.; PESSOTTI, V. S.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A.; Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**. Viçosa. v. 33, n.6., 2009.

YEOMAN, M. M.; Arry development in callus culture. **International Review of Cytology**. 29:383-409, 1970.