

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

DANIELE DAMIAN DOS SANTOS

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Plinia peruviana* (POIR.)
GOVAERTS (MYRTACEAE): UMA ANÁLISE MORFOANATÔMICA DA
CALOGÊNESE E DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

**São Gabriel
2023**

DANIELE DAMIAN DOS SANTOS

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Plinia peruviana* (POIR.)
GOVAERTS (MYRTACEAE): UMA ANÁLISE MORFOANATÔMICA DA
CALOGÊNESE E DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Valdir Marcos Stefenon

Coorientador: Dr. Igor Poletto

São Gabriel

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

S237g Santos, Daniele Damian dos

Germinação e morfogênese in vitro de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts (Myrtaceae): Uma análise morfoanatômica da calogênese e da embriogênese somática / Daniele Damian dos Santos.

142 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2023.

"Orientação: Valdir Marcos Stefenon".

1. Jabuticabeira. 2. Biotecnologia. 3. Propagação in vitro. 4. Caracterização anatômica e ultraestrutural. I. Título.

DANIELE DAMIAN DOS SANTOS

**GERMINAÇÃO E MORFOGÊNESE IN VITRO DE *Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS
(MYRTACEAE): UMA ANÁLISE MORFOANATÔMICA DA CALOGÊNESE E DA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas

Tese defendida e aprovada em: 31, março de 2023.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon

Orientador

UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Rosete Pescador

UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Juçara Terezinha Paranhos

UFSM

Prof. Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro

UEMA



Assinado eletronicamente por **Marcos Vinícius Marques Pinheiro, Usuário Externo**, em 06/04/2023, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Valdir Marcos Stefenon, Usuário Externo**, em 06/04/2023, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Rosete Pescador, Usuário Externo**, em 07/04/2023, às 20:21, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Juçara Terezinha Paranhos, Usuário Externo**, em 17/04/2023, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1094336** e o código CRC **537D2133**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a conclusão de uma grande etapa e sonho de vida, e que apesar de todos os contratemplos ao longo dos 4 anos, me fez conhecer pessoas incríveis que contribuíram para minha formação como pesquisadora e como ser humano.

Aos meus pais, Antonio (*in memoriam*) e Silvana, por me incentivarem e serem meus grandes apoiadores. Desde muito pequena me diziam que “se eu quisesse ser alguém na vida, eu teria que estudar muito”, e eu realmente levei para a vida esse ensinamento. Aos meus irmãos, Alan e Eduardo, simplesmente por fazerem parte da minha vida, e mesmo à distância terem participado, elogiado e me incentivado em momentos importantes. Família, amo vocês sem limites, para todo e sempre. Obrigada por tanto.

Ao Adriano, meu parceiro de vida, aquele que em momentos de incertezas e obstáculos me acolhia e dizia que tudo ia dar certo. “Deu errado? Quais são as soluções? Você é capaz e inteligente!”. Obrigada por acreditar nos meus sonhos, mesmo que isso tenha nos custado, em muitos momentos, alguns km de distância. Teu apoio no dia a dia, fez e faz toda a diferença. Também agradeço pela paciência, pelos abraços e por ser a paz que eu tanto precisei.

Ao meu orientador, Professor Valdir Stefenon, pelos grandes ensinamentos, paciência, disponibilidade e olhar acolhedor. E acima de tudo, por acreditar em meu potencial como acadêmica, e sempre afirmar que confiava em mim e que eu era capaz, até mesmo em momentos que eu duvidava que conseguiria. Foi muito além de ensinamentos acadêmicos, foram ensinamentos de vida, de humildade, persistência e comprometimento. Grata pelos anos de convivência, mesmo grande parte sendo EAD, acredito que conseguimos “tirar de letra”.

A Luana e Dalvan, meus colegas e amigos de alma, obrigada por todos os momentos juntos, bons e outros nem tanto, mas seguíamos nos apoiando e incentivando. Vocês foram duas pessoas cruciais no meu Doutorado, concluíram seus mestrados e cada um seguiu seu caminho, mas não perdemos o contato. O melhor grupo de WhatsApp, onde se compartilhava ciência, vida pessoal, alegrias, inseguranças e anseios. Formamos um trio mais que completo.

A Mara Rangel, que foi um dos grandes presentes que ganhei em São Gabriel. Uma mãezona com uma sensibilidade ímpar, no qual tive o privilégio de conhecer e me acolheu com tanto carinho em sua morada. Obrigada por seu olhar afetuoso, pela confiança, amor e carinho de mãe.

Aos membros da banca de qualificação e defesa final, Prof^a Juçara Paranhos, Prof. Marcos Pinheiro e Prof^a Rosete Pescador, pelas contribuições mais que valiosas, pelo olhar crítico e construtivo. Sou muito grata por terem participado, de maneira tão significativa e enriquecedora, de momentos ímpares em minha vida acadêmica.

A Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) pelo ensino público, gratuito e de qualidade, pela oportunidade de experienciar esse momento importantíssimo de minha vida acadêmica. Aos professores do PPG em Ciências Biológicas pelos ensinamentos, ao Prof. Adriano Schünemann, coordenador do Programa, por ter me auxiliado em processos administrativos e sanado dúvidas, após a transferência de meu orientador para UFSC. Aos demais colegas do programa e TAEs que contribuíram, de alguma forma, para conclusão dessa etapa.

Ao NEVA (Núcleo de Estudos da Vegetação Antártida) e ao Prof. Filipe Victória, responsável pelo laboratório, pelo acolhimento, ajuda e disponibilidade do espaço físico para desenvolvimento de boa parte de meus experimentos. Estendo meu agradecimento aos demais colegas do NEVA, pelos momentos e bom convívio de laboratório.

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Campus Itacurubi e Campus Trindade, em especial ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada (NBA) e ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pela estrutura física para realização da Microscopia óptica e eletrônica. A pós-doutoranda Márcia Fanta pelo auxílio e ajuda técnica no desenvolvimento dessas análises. E aos demais colegas de laboratório que me receberam super bem.

A loja Quero-Quero de São Gabriel – RS, na qual em seu pátio está situada a jabuticabeira que realizei as coletas dos frutos. Agradeço aos colaboradores da empresa por terem sido acessíveis e atenciosos. Sempre que possível, se disponibilizavam para me auxiliar na coleta com muito entusiasmo e respeito.

A CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos, e ao CNPq pelos recursos financeiros que permitiram a realização de todo trabalho.

A todos que de uma maneira ou outra fizeram parte dessa inesquecível trajetória.

Foi uma honra poder dividir meus dias com todos vocês, o meu sincero muito

obrigada! ♥

“Não é o mais forte que sobrevive. Nem o mais inteligente. Mas o que melhor se adapta as mudanças.”

Darwin

RESUMO

Plinia peruviana (Poir.) Govaerts conhecida popularmente como jabuticabeira é uma espécie nativa do Brasil e pertencente à família Myrtaceae. Um obstáculo encontrado para a produção comercial de mudas é a sua propagação, sendo considerada de difícil cultivo quando propagada por sementes (devido a assíncronia no desenvolvimento de mudas, longo período juvenil e sementes com características de recalcitrância) ou através da propagação vegetativa convencional (taxas de enraizamento obtidas são moderadas a baixas, além da ausência de estudos focando no desenvolvimento a longo prazo das mudas a campo). Há uma perspectiva de crescimento na comercialização e utilização pelas indústrias, com isso estudos relacionados a propagação e conservação da espécie tornam-se necessários. Assim, a presente tese está estruturada em três capítulos. O capítulo I apresenta uma revisão de literatura, atualizando o estado da arte do uso de ferramentas biotecnológicas em *Plinia* spp., enfatizando a necessidade do uso de abordagens moleculares para resolver as incertezas taxonômicas entre as espécies e o estabelecimento de protocolos de propagação *in vitro* para superar as dificuldades relacionadas ao seu cultivo. O capítulo II visa a germinação de sementes e a calogênese *in vitro*, além da caracterização morfoanatômica dos calos. Para germinação *in vitro* testou-se métodos de desinfestação das sementes (com álcool 70%, NaOCl e água ultrapura autoclavada), e para calogênese explantes (segmentos nodais e discos foliares) e combinações de ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina). Houve sucesso no estabelecimento de plântulas de jabuticabeira a partir da germinação *in vitro*, indicando-se o álcool 70% por 2 minutos e o enxágue triplo em água ultrapura autoclavada para desinfestação das sementes, promovendo o melhor IVG e com germinação de 98%. A calogênese e rizogênese em segmentos nodais ocorreu tanto na ausência como presença de PGRs (ANA e BAP), e em discos foliares somente com a adição de PGRs no meio de cultivo, em concentrações iguais ou superiores a 5,40 μM de ANA + 0,44 μM de BAP. Os calos obtidos apresentaram características não embriogênicas, com células parenquimáticas grandes, desorganizadas e vacuolizadas. O capítulo III objetiva a indução da embriogênese somática (ES) a partir de explantes obtidos de sementes maduras, testando-se

concentrações (10, 20 e 30 μM) de 2,4-D e tempos de exposição (1, 3, 5 e 7 dias), além da caracterização morfoanatômica e ultraestrutural de embriões somáticos e/ou calos. A formação de embriões somáticos ocorreu de maneira direta nos explantes (sem necessidade de formação de calos), assíncrona e com desenvolvimento de alguns embriões anômalos, além da ocorrência de embriogênese somática repetitiva. A ES foi dependente da adição de 2,4-D em meio de cultura, com destaque para a concentração de 20 μM de 2,4-D por 5 dias de exposição, que promoveu o percentual de formação de 26,66%. Com as análises anatômicas e ultraestruturais os embriões foram caracterizados em diferentes estádios de desenvolvimento e foi possível identificar algumas anormalidades (embriões fusionados, ausência ou formação de apenas um ou múltiplos cotilédones, ausência ou pouco desenvolvimento de células procambiais, cotilédones anormais e não formação de meristema apical). A calogênese foi dependente da adição de 2,4-D em meio de cultivo, e a concentração de 20 μM de 2,4-D por 1 dia de exposição foi a mais promissora. Os calos apresentaram morfologia e coloração diversa com presença de células não embriogênicas. As análises desenvolvidas no presente estudo podem contribuir para que novos protocolos de propagação *in vitro* sejam aprimorados em *P. peruviana*.

Palavras-chave: Jabuticabeira. Biotecnologia. Propagação *in vitro*. Caracterização anatômica e ultraestrutural.

ABSTRACT

Plinia peruviana (Poir.) Govaerts popularly known as jabuticabeira is a species native to Brazil and belonging to the Myrtaceae family. An obstacle found for the commercial production of seedlings is their propagation, being considered difficult to cultivate when propagated by seeds (due to asynchrony in the development of seedlings, long juvenile period and seeds with recalcitrance characteristics) or through conventional vegetative propagation (rates rooting rates obtained are moderate to low, in addition to the absence of studies focusing on the long-term development of seedlings in the field). There is a prospect of growth in commercialization and use by industries, with that studies related to the propagation and conservation of the species become necessary. Thus, this thesis is structured in three chapters. Chapter I presents a literature review, updating the state of the art in the use of biotechnological tools in *Plinia* spp., emphasizing the need to use molecular approaches to resolve taxonomic uncertainties between species and the establishment of *in vitro* propagation protocols to overcome the difficulties related to its cultivation. Chapter II focuses on seed germination and *in vitro* callogenesis, in addition to the morphoanatomical characterization of calluses. For *in vitro* germination, seed disinfestation methods were tested (with 70% alcohol, NaOCl and autoclaved ultrapure water), and for callogenesis explant sources (nodal segments and leaf discs) and combinations of NAA (naphthaleneacetic acid) and BAP (6 - benzylaminopurine). There was success in the establishment of jabuticabeira seedlings from *in vitro* germination, indicating 70% alcohol for 2 minutes and triple rinsing in autoclaved ultrapure water for seed disinfestation, promoting the best GSI and with 98% germination. Callogenesis and rhizogenesis in nodal segments occurred both in the absence and presence of PGRs (NAA and BAP), and in leaf discs only with the addition of PGRs in the culture medium, in concentrations equal to or greater than 5.40 μM of NAA + 0.44 μM BAP. The calli obtained showed non-embryogenic characteristics, with large, disorganized and vacuolated parenchyma cells. Chapter III aims at the induction of somatic embryogenesis (ES) from explants obtained from mature seeds, testing concentrations (10, 20 and 30 μM) of 2,4-D and exposure times (1, 3, 5 and 7 days), in addition to the morphoanatomical and ultrastructural characterization of somatic embryos and/or calluses. The formation

of somatic embryos occurred directly in the explants (without the need for callus formation), asynchronously and with the development of some anomalous embryos, in addition to the occurrence of repetitive somatic embryogenesis. SE was dependent on the addition of 2,4-D in the culture medium, with emphasis on the concentration of 20 μ M of 2,4-D for 5 days of exposure, which promoted the percentage of formation of 26.66%. With the anatomical and ultrastructural analyses, the embryos were characterized at different stages of development and it was possible to identify some abnormalities (fused embryos, absence or formation of only one or multiple cotyledons, absence or little development of procambial cells, abnormal cotyledons and no meristem formation apical). Callogenesis was dependent on the addition of 2,4-D in the culture medium, and the concentration of 20 μ M of 2,4-D for 1 day of exposure was the most promising. The calli showed different morphology and coloration with the presence of non-embryogenic cells. The analyzes developed in the present study can contribute to the improvement of new *in vitro* propagation protocols in *P. peruviana*.

Keywords: Jaboticabeira. Biotechnology. *In vitro* propagation. Anatomical and ultrastructural characterization.

LISTA DE FIGURAS

3 REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Aspectos da flor, fruto e semente de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts. A. Botão floral. B. Botão floral seccionado. C. Flor hermafrodita. D. Androceu (Filete e antera). E. Gineceu (Estigma e estilete) F. Fruto maduro. G. Semente. H. Semente dividida ao meio evidenciando o eixo embrionário aderido ao cotilédone (Fonte: De autoria própria). 31

4 CAPÍTULO I

Figure 1. (A) Distribution of *Plinia* species in neotropical South and Central America according to the Plants of the World platform (www.plantsoftheworldonline.org). CU: Cuba, HA: Haiti, SD: San Domingo, BZ: Belize, GU: Guatemala, HO: Honduras, CR: Costa Rica, PN: Panamá, CO: Colombia, VE: Venezuela, GU: Guyana, SU: Suriname, EQ: Equador, PE: Peru, BO: Bolivia, BR: Brazil, PY: Paraguay, AR: Argentina, UR: Uruguay. (B) Adult tree of *Plinia peruviana* growing in an urban backyard. (C) Flowers growing along the tree stem. (D) Rip fruits along the tree stem. 56

Figure 2. Phylogenomic analysis based on the whole plastome sequences of *Plinia cauliflora*, *P. aureana*, *P. trunciflora*, *Acca sellowiana*, *Campomanesia xanthocarpa*, and *Allosyncarpia ternata*. The phylogenomic tree was obtained using the maximum likelihood algorithm, the GTR+G evolution model, and 1000 bootstrap replications for branch support, as implemented in the software RAxML, CIPRES Science Gateway V. 3.1 platform. *Allosyncarpia ternata* (Myrtaceae, Eucalypteae) was employed as an outgroup. All other species belong to the family Myrtaceae, tribe Myrteae. 61

Figura 3. *In vitro* germination of *Plinia* spp. (A) *In vitro* axenic germination of seeds. (B) Germination of a single plantlet from the seed. (C) Polyembryony with four plantlets germinated from a single seed. 62

5 CAPÍTULO II

Figura 1. Germinação *in vitro* de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts em meio de cultura contendo ágar e água ultrapura aos 60 dias após inoculação. As sementes foram desinfestadas com álcool 70% + água ultrapura autoclavada (A, C e D) e álcool 70% + hipoclorito de sódio a 1,25% por 10 minutos + água ultrapura autoclavada (B). A e B: Obtenção de uma plântula de jaboticabeira a partir de uma

semente. C e D: Poliembriõnia evidente através da obtenção de mais de uma plântula de jabuticabeira a partir de uma semente. Barras = A, B, C e D: 1,0 cm. 75

Figura 2. Calogênese em *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, obtido a partir de segmentos nodais e discos foliares após serem submetidos a diferentes concentrações hormonais. T1: Controle (sem reguladores de crescimento); T2: 2,70 µM de ANA + 0,22 µM de BAP; T3: 5,40 µM de ANA + 0,44 µM de BAP; T4: 8,1 µM de ANA + 0,66 µM de BAP; T5: 10,80 µM de ANA + 0,88 µM de BAP; T6: 13,5 µM de ANA + 1,1 µM de BAP. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, dentro de diferentes explantes, e maiúsculas, dentro dos mesmos explantes, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. 79

Figura 3. Calogênese e rizogênese *in vitro* de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts obtida a partir de segmentos nodais (A, B, C, D, E) e discos foliares (F) de plântulas germinadas *in vitro*, em meio de cultivo suplementado com 5,40 µM de ANA + 0,44 µM de BAP (A, B, F), 8,1 µM de ANA + 0,66 µM de BAP (C), 13,5 µM de ANA + 1,1 µM de BAP (D) e 2,70 µM de ANA + 0,22 µM de BAP (E) aos 60 e 100 dias após inoculação, para calogênese e rizogênese, respectivamente. Abreviações: (Ca) calo; (Ex) explante; (Ra) raiz. Barras = A, B, C e D: 0,2 cm; E e F: 0,4 cm. 81

Figura 4. Aspectos histológicos de calos obtidos a partir de segmentos nodais e discos foliares de plântulas germinadas *in vitro* de jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts). A e B: Cortes histológicos de calos não embriogênicos obtidos a partir de segmentos nodais em meio de cultura contendo 2,70 µM de ANA + 0,22 µM de BAP (T2). C e D: Cortes histológicos de calos não embriogênicos obtidos a partir de discos foliares em meio de cultura contendo 8,1 µM de ANA + 0,66 µM de BAP (T4). Abreviações: (Ca) calo; (Ex) explante; (Ra) raiz. Barras = A: 50 µm; B: 500 µm; C: 50 µm; D: 100 µm. 83

Figura 5. Calos rizogênicos em *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts obtidos aos 100 dias após inoculação, a partir de segmentos nodais e discos foliares ao serem submetidos a diferentes concentrações hormonais. T1: Controle (sem reguladores de crescimento); T2: 2,70 µM de ANA + 0,22 µM de BAP; T3: 5,40 µM de ANA + 0,44 µM de BAP; T4: 8,1 µM de ANA + 0,66 µM de BAP; T5: 10,80 µM de ANA + 0,88 µM de BAP; T6: 13,5 µM de ANA + 1,1 µM de BAP. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, dentro de diferentes explantes, e maiúsculas, dentro dos mesmos explantes, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. 84

6 CAPÍTULO III

Figura 1. Aspectos do fruto e semente de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts. A: Fruto maduro com epicarpo roxo escuro. B: Semente inteira após o despulpamento. C: Semente dividida ao meio, contendo um cotilédone e um embrião resultante da fecundação, utilizado como explante para indução da embriogênese somática. Barras = A: 1 cm; B e C: 3 mm (Fonte: De autoria própria)..... 96

Figura 2. Embriogênese somática a partir de explantes obtidos de sementes maduras de jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts), em meio de cultivo suplementado com 20 μM de 2,4-D aos 30 (A, B, C, D e H), 60 (G) e 90 dias (E e F) após inoculação. A, B, C, D, E e F: Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. E e F: Coloração esverdeada e arroxeadada obtida pelos embriões somáticos após transferência para condições de luminosidade. G: Embriogênese somática secundária. H: Anormalidade morfológica apresentando a fusão de embriões somáticos na porção basal. Abreviações: (Ex) explante; (Ra) raiz; (Ts) tegumento da semente; (Ess) embrião somático secundário; (seta) anormalidade morfológica; (asterisco) antocianinas. Barras = 1 mm..... 101

Figura 3. Aspectos morfológicos e histológicos de calos a partir de explantes obtidos de sementes maduras de jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts), em meio de cultivo suplementado com 30 μM de 2,4-D aos 40 (B) e 60 dias (A e C) após inoculação. A, B e C: Calos com morfologia e coloração diversa. D: Secção anatômica de calo representado pela letra C, evidenciando células com características não embriogênicas. Abreviações: (Ex) explante; (Ra) raiz. Barras = A, B e C: 5 mm; D: 50 μm 105

Figura 4. Aspectos anatômicos de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento a partir de explantes obtidos de sementes maduras de jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts), em meio de cultivo suplementado com 30 μM de 2,4-D. A: Secção anatômica de embrião somático em estágio globular. B: Detalhe da secção demarcada na letra A, que evidencia a protoderme e meristema fundamental. C e E: Secção anatômica de embrião somático em transição do estágio globular para cordiforme. D: Detalhe da secção demarcada na letra C, que evidencia as células procambiais. F: Detalhe da secção demarcada na letra E, que evidencia a protoderme e meristema fundamental. G: Secção anatômica de embrião somático em estágio cordiforme. H: Detalhe da secção demarcada na letra G, que evidencia a protoderme e meristema fundamental. I: Secção anatômica de embrião somático com desenvolvimento anormal. J: Detalhe da secção demarcada na letra I, que evidencia a protoderme, procâmbio e meristema fundamental. Abreviações: (Pt) protoderme; (Mf) meristema fundamental; (Pc) procâmbio; (asterisco) embrião somático sobreposto. Barras = A e C: 100 μm ; B, D, F e J: 50 μm ; E, G e I: 200 μm ; H: 20 μm 111

Figura 5. Aspectos ultraestruturais de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento a partir de explantes obtidos de sementes maduras de jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts), em meio de cultivo suplementado com 20 µM de 2,4-D durante 5 dias de exposição. A: Embrião somático em estágio globular. B: Embrião somático em estágio cordiforme. C: Embrião somático em estágio torpedo. D: Detalhe do embrião somático apresentado na letra C evidenciando os cotilédones. E: Embrião somático morfologicamente anormal. F: Detalhe do embrião somático apresentado na letra E evidenciando múltiplos cotilédones. G e H: Detalhe da protoderme e estômatos em embriões somáticos. Abreviações: (Pt) protoderme; (Co) cotilédone; (Os) ostíolo; (Cg) célula guarda; (Cs) célula subsidiária; (Su) suspensor..... 113

LISTA DE TABELAS

4 CAPÍTULO I

Table 1. Morphological characteristics of *Plinia cauliflora*, *P. jaboticaba* and *P. aureana* according to Lorenzi (2000), Lorenzi et al. (2006), and Lorenzi (2011).. 58

Table 2. Morphological characteristics of *Plinia coronata*, *P. grandifolia* and *P. oblongata* according to Lorenzi (2000), Lorenzi et al. (2006), and Lorenzi (2011).
..... 59

Table 3. Morphological characteristics of *Plinia peruviana*, *P. phitrantha* and *P. spiritosantensis* according to Lorenzi (2000), Lorenzi et al. (2006), and Lorenzi (2011).
..... 60

5 CAPÍTULO II

Tabela 1. Tratamentos utilizados na desinfestação das sementes de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts para realização da germinação *in vitro*.
..... 70

Tabela 2. Tratamentos utilizados para indução da calogênese em segmentos nodais e discos foliares de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts. 72

Tabela 3. Percentuais de germinação, plântulas normais e contaminação, e índice de velocidade de germinação (IVG) obtidos a partir da germinação *in vitro* de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, após as sementes serem submetidas a métodos de desinfestação aos 60 dias após inoculação. 74

Tabela 4. Altura da maior parte aérea (cm), número de folhas, número de nós caulinares, número de raízes e comprimento da maior raiz (cm), obtidos a partir da germinação *in vitro* de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts após as sementes serem submetidas a diferentes métodos de desinfestação aos 60 dias após inoculação.
..... 78

6 CAPÍTULO III

Tabela 1. Tratamentos utilizados para indução da embriogênese somática a partir de explantes obtidos de sementes maduras de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts.
..... 97

Tabela 2. Percentuais de embriões somáticos e calos a partir de explantes obtidos de sementes maduras de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, após serem submetidas

a diferentes concentrações hormonais e tempos de exposição ao 2,4-D aos 60 dias após inoculação. 102

Tabela 3. Percentuais de eixos embrionários germinados, explantes contendo raízes, oxidação e contaminação a partir explantes obtidos de sementes maduras de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, após serem submetidas a diferentes concentrações hormonais e tempos de exposição ao 2,4- D aos 60 dias após inoculação. 108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ág. aut. – Água ultrapura autoclavada
ANA – Ácido naftalenoacético
ANOVA – Análise de variância
atm – Atmosfera
ATPs – Adenosina trifosfato
BAP – 6-benzilaminopurina
BOD - Biochemical Oxygen Demand
CEAGESP – Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo
CEASA – Centrais de abastecimento
Ca – Calo
Cg – Célula guarda
cm – Centímetros
cm² – Centímetro quadrado
Co – Cotilédone
CO₂ – Dióxido de carbono
Cs – Célula subsidiária
d.a.i – Dias após inoculação
e - Explante
ES – Embriogênese somática
Ess – Embrião somático secundário
Ex – Explante
g – Gramas
g L⁻¹ – Grama por litro
GA₃ – Ácido giberélico
IBA – Ácido indolbutírico
ISSR – Inter Simple Sequence Repeats
IVG – Índice de velocidade de germinação
L – Litros
m - Metros
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
mg – Miligramas

MG – Minas Gerais
Mf – Meristema fundamental
min. – Minutos
mL – Mililitros
mm – Milímetros
MO – Microscopia óptica de luz
MS – Murashige e Skoog
NaOCl – Hipoclorito de sódio
nº - Número
ns – Não significativo
nm – Nanômetro
Os – Ostíolo
p – Probabilidade
Pc – Procâmbio
PEG – Polietilenoglicol
PGRs – Reguladores de crescimento de plantas
pH – Potencial hidrogeniônico
PR – Paraná
Pt – Protoderme
PVC – Policloreto de vinila
PVP – Polivinilpirrolidona
Ra - Raiz
RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA
RNA – Ácido ribonucleico
RS – Rio Grande do Sul
Su - Suspensor
SP – São Paulo
sp. – Espécie
spp. – Espécies
T - Tratamento
TDZ – Thidiazuron
Ts – Tegumento da semente
v/v – Volume/volume

°C – Celsius

% - Porcentagem

μm – Micrometro

μM – Micromolar

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3 REVISÃO DE LITERATURA	29
3.1 Família Myrtaceae e <i>Plinia peruviana</i> (Poir.) Govaerts	29
3.2 O que torna a jaboticabeira promissora?.....	31
3.3 Propagação das jaboticabeiras	33
3.3.1 Propagação vegetativa convencional	34
3.3.2 Propagação através da germinação <i>ex vitro</i> de sementes.....	35
3.3.3 Propagação <i>in vitro</i>	37
3.3.3.1 Germinação de sementes	37
3.3.3.2 Embriogênese somática	38
3.3.3.3 Calogênese	41
3.4 Análises anatômicas e ultraestruturais	42
REFERÊNCIAS	44
4 CAPÍTULO I	55
Biotechnology in <i>Plinia</i> spp. needs and perspectives for a neglected group of fruit species	55
ABSTRACT	55
INTRODUCTION	56
Expanding genetic and genomic analyses are needed to disentangle the subtle inter-species morphological difference	57
Germplasm conservation and genetic improvement also need molecular genetic studies.....	57
Moderate to low rooting rates is the main limitation for traditional vegetative propagation of <i>Plinia</i> species.....	59
Protocols of <i>in vitro</i> propagation are promising strategies for <i>Plinia</i> spp.	61
How may biotechnology help to boost jaboticaba into the market?	63
CONCLUSIONS	63

REFERENCES.....	63
5 CAPÍTULO II	67
GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CALOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE <i>Plinia peruviana</i>	
(POIR.) GOVAERTS (MYRTACEAE)	67
RESUMO.....	67
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1 Germinação <i>in vitro</i> de sementes e estabelecimento de plântulas.....	69
2.2 Indução da calogênese <i>in vitro</i>	71
2.3 Análises anatômicas.....	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1 Germinação <i>in vitro</i> de sementes e estabelecimento de plântulas.....	73
3.2 Indução da calogênese <i>in vitro</i>	78
3.3 Calos rizogênicos em segmentos nodais e discos foliares.....	83
4 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS.....	87
6 CAPÍTULO III	92
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM <i>Plinia peruviana</i> (POIR.) GOVAERTS	
(MYRTACEAE)	92
RESUMO.....	92
1 INTRODUÇÃO	93
2 MATERIAIS E MÉTODOS	95
2.1 Seleção e desinfestação do material vegetal	95
2.2 Indução da embriogênese somática.....	96
2.3 Maturação dos embriões somáticos.....	97
2.4 Conversão dos embriões somáticos em plantas completas.....	97
2.5 Análises anatômicas e ultraestruturais	98
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.1 Indução da embriogênese somática.....	99
3.2 Maturação dos embriões somáticos.....	105
3.3 Conversão dos embriões somáticos em plantas completas.....	106
3.4 Eixos embrionários germinados, explantes contendo raízes, oxidação e contaminação.....	107

3.5 Análises anatômicas e ultraestruturais	109
4 CONCLUSÃO	114
REFERÊNCIAS.....	115
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
REFERÊNCIAS.....	124

1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Myrtaceae compreende aproximadamente 156 gêneros e 7000 espécies (GOVAERTS et al., 2019), distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Segundo Manica (2002) dentre os gêneros da família que englobam espécies frutíferas, apenas quatro têm importância econômica (*Acca*, *Psidium*, *Eugenia* e *Plinia*). A espécie *A. sellowiana* (Berg.) Burret. (feijoa), *P. guajava* L. (goiabeira), e para o gênero *Eugenia* muitas espécies são fornecedoras de frutos comestíveis, a exemplo a *E. involucrata* DC. (cerejeira-do-mato), *E. pyriformis* Cambess (uvaia) e *E. uniflora* L. (pitangueira). As espécies do gênero *Plinia* compreendem as jabuticabeiras (LORENZI, 2011).

Plinia peruviana (Poir.) Govaerts conhecida popularmente como jabuticabeira ou jabuticaba-de-cabinho, é nativa do Brasil e de distribuição restrita às regiões Sul e Sudeste do país (ALMEIDA-TEIXEIRA et al., 2011). Os frutos apresentam elevado valor nutritivo e a casca contém alto teor de antocianinas e polifenóis, compostos que apresentam efeitos fisiológicos benéficos à saúde humana (INADA et al., 2015; RUFINO et al., 2011), e responsáveis pelas propriedades antioxidantes, antiproliferativas, antihiperlipidêmicas e antimicrobianas (FIDELIS et al., 2021; ALBUQUERQUE et al., 2020; FIDELIS et al., 2020). Os frutos são apreciados principalmente para consumo *in natura* no período de safra, e para estender esse consumo, produtos vêm sendo desenvolvidos e avaliados (doces, geleias, licores, conhaque, jeropiga (vinho artificial), vinagre, suco e xarope), a fim de se manter os benefícios da jabuticaba durante todo o ano (TEIXEIRA et al., 2008).

A espécie apresenta uma característica curiosa e peculiar: o desenvolvimento de flores e frutos agrupados no tronco e ramos da árvore (cauliflora) (SANTOS et al., 2021), podendo ser utilizada como planta ornamental devido ao seu aspecto atraente, durante a floração e frutificação (DANNER et al., 2006). A produção comercial da jabuticabeira é escassa e dependente do desenvolvimento de atividades e tecnologias, que incluam a caracterização de germoplasma, seleção de genótipos superiores da espécie (domesticação) e o desenvolvimento de métodos eficientes de propagação (CITADIN et al., 2010), a fim de propiciar as condições para o desenvolvimento de trabalhos futuros voltados

ao melhoramento genético e subsidiar estratégias de conservação de germoplasma (WAGNER JÚNIOR et al., 2022).

Para isso, os mesmo autores acreditam ser necessário a seleção de variedades adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas das regiões brasileiras; que produzam grande número de frutos, com maior durabilidade e qualidade, com padronização do tamanho e sabor; bem como plantas com baixo porte, para permitir maior adensamento de plantio, facilitando o manejo e a colheita; e selecionar plantas com baixo período de juvenilidade, para acelerar a entrada em produção e, conseqüentemente, o retorno econômico ao fruticultor.

A principal forma de propagação das jabuticabeiras é a partir das sementes, porém as mudas obtidas não se desenvolvem de forma sincrônica, além de um longo período juvenil que pode se estender por até 14 anos (HARTMANN et al., 2011). Cada fruto possui de uma a quatro sementes, que apresentam características de recalcitrância, sendo fator limitante para expansão de pomares comerciais por meio da propagação sexuada. Além disso, as jabuticabeiras apresentam poliembrionia, sendo possível obter mais de uma plântula a partir de uma única semente (HOSSEL et al., 2013).

Mesmo com avanços nos métodos convencionais de propagação vegetativa das jabuticabeiras alguns problemas ainda são enfrentados. As taxas de enraizamento obtidas são consideradas moderadas a baixas, além da ausência de estudos focando no desenvolvimento a longo prazo das mudas a campo, sendo fator limitante para propagação da espécie pelos métodos de estaquia, alporquia, enxertia e mergulhia (SANTOS et al., 2022; BAPTISTA et al., 2020; SILVA et al., 2019; CASSOL et al., 2017; CASSOL et al., 2015; FRANCO et al., 2010; SARTOR et al., 2010; DANNER et al., 2006). Estudos de micropropagação ainda são escassos para a espécie, no entanto, face ao exposto tornam-se necessários com o intuito de estabelecer protocolos para produção de mudas.

A micropropagação é considerada a aplicação de maior impacto da cultura de tecidos, em vista permitir condições para se obterem plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em ambiente estéril e controlado, e em menor espaço de tempo. A aplicação da técnica é dependente da indução e controle da morfogênese *in vitro*, podendo ser conduzida em duas rotas: a organogênese e a

embriogênese somática, diretamente a partir dos explantes ou indiretamente dos calos (HARTMANN et al., 2011).

Para embriogênese somática há apenas um estudo publicado para a espécie em estudo, na qual a indução da ES foi realizada a partir de sementes maduras divididas ao meio (contendo um cotilédone e um embrião resultante da fecundação), com maior percentual de formação em meio MS com 1000 mg L⁻¹ de glutamina e 10 µM de 2,4-D por 60 dias de exposição. Quando transferidos para meio de maturação a suplementação com 60 g L⁻¹ de PEG 6000 foi benéfica para promover um avanço nos estádios de desenvolvimento (SILVEIRA et al., 2020). Para outras espécies de jabuticabeira, como *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel o maior percentual de embriões somáticos a partir de explantes obtidos de sementes maduras foi com o uso de 15 µM de 2,4-D por 60 dias de exposição (OLIVEIRA et al., 2022). Em ambos os estudos ocorreram anormalidades morfológicas (cotilédones fundidos ou formação de múltiplos cotilédones) e anatômicas (zonas de cicatrização com acúmulo de compostos fenólicos e morte celular), possivelmente decorrente do período prolongado de exposição ao 2,4-D. Além disso, não houve conversão dos embriões somáticos em plantas completas.

Adicionalmente, observa-se uma perspectiva de crescimento na comercialização e utilização pelas indústrias dos frutos da jabuticabeira, e para isso o desenvolvimento da pesquisa básica e tecnológica é o passo inicial para possibilitar domesticação e conseqüentemente ampliar o cultivo comercial, que ainda é incipiente e limitado a determinadas regiões do Brasil. Desta forma, estudos relacionados a propagação *in vitro* de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts tornam-se necessários e são importantes para preservação do germoplasma de interesse em condições controladas, com a máxima integridade genética e biológica possível (LIMA et al., 2021). Além disso, análises morfoanatômicas e ultraestruturais durante o cultivo *in vitro* tornam-se importantes para caracterizar o processo e as vias de regeneração de plantas *in vitro* (BARRACO et al., 2014; YIL et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver protocolos de propagação *in vitro* a partir da germinação, calogênese e embriogênese somática de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, com caracterização morfoanatômica e ultraestrutural de calos e/ou embriões somáticos.

2.2 Objetivos específicos

- Atualizar o estado da arte quanto ao uso de ferramentas biotecnológicas em estudos sobre a diversidade taxonômica e genética, e de propagação vegetativa de *Plinia* spp.

- Desenvolver um método de desinfestação das sementes de *P. peruviana*, para obtenção de plântulas assépticas a partir da germinação *in vitro*.

- Estabelecer um protocolo de calogênese *in vitro* de *P. peruviana* a partir de segmentos nodais, discos foliares e sementes maduras divididas ao meio (contendo um cotilédone e um embrião resultante da fecundação).

- Estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* de *P. peruviana* via embriogênese somática.

- Realizar a caracterização morfoanatômica e ultraestrutural de calos e/ou embriões somáticos de *P. peruviana*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Família Myrtaceae e *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts

A família Myrtaceae é considerada monofilética pertencente à ordem Myrtales (GOVAERTS et al., 2019). Dentro dessa família, estão incluídas frutíferas bastante conhecidas como a goiaba, pitanga, guabiroba, cravo-da-índia, cambuí, araçá, grumixama, cambucá e pêssego-do-mato. Considerada uma das maiores famílias da flora brasileira, sendo constituída por cerca de 23 gêneros e 1029 espécies (SOBRAL et al., 2015). Do ponto de vista taxonômico, Myrtaceae é uma das mais complexas famílias botânicas, devido ao grande número de espécies e escassez de estudos taxonômicos (SOUZA; LORENZI, 2008).

Dentre os gêneros classificados taxonomicamente dentro da família Myrtaceae encontra-se *Plinia*, no qual estão incluídas 80 espécies (GOVAERTS et al., 2008), com destaque as mais cultivadas e apreciadas, *P. peruviana* (Poir.) Govaerts, *P. jaboticaba* (Vell.) Berg, e *P. cauliflora* (Mart.) Kausel, conhecidas popularmente por jabuticabeira (CITADIN et al., 2010). Em 1985, Sobral propôs a alteração nomenclatural do gênero *Myrciaria* (BERG, 1857) para o gênero *Plinia*, porém *Myrciaria* é ainda empregado no meio científico podendo ser considerado como sinonímia de *Plinia* (SASSO, 2009). O cálice persistente na antese, não decíduo, e a presença nas sementes de cotilédones separados são características que divergiam de outras espécies do gênero *Myrciaria*, e tornaram a reclassificação necessária (SOBRAL, 1985; KAUSEL, 1956).

Plinia peruviana (Poir.) Govaerts (sinonímia *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) é uma espécie nativa do Brasil, com distribuição restrita às regiões Sul e Sudeste do País, desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, além disso ocorre em outros países como Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (SOBRAL et al., 2015; SOBRAL et al., 2014), sendo conhecida popularmente como jabuticaba-de-cabinho, jabuticaba-de-pena, jabuticaba-café e jabuticaba-preta. A espécie floresce principalmente de dezembro a fevereiro, com o desenvolvimento de flores e frutos agrupados no tronco e ramos da árvore (LORENZI, 2011).

Em relação as características morfológicas da espécie, a árvore apresenta altura de 4 - 14 metros, com copa densa e globosa, tronco reto e nodoso, e casca lisa de cor pardo-amarronzada com manchas mais claras. As folhas apresentam comprimento de 2 - 7 cm, com lâmina lanceolada a ovado-lanceolada, ápice longo-acuminado e base obtusa ou cordada, com nervuras secundárias pouco evidentes e duas marginais. O botão floral é globoso (Figura 1 - A e B) de cerca de 0,5 cm de diâmetro e a inflorescência composta de 4 - 8 flores brancas. Flores hermafroditas, ou seja, com órgãos reprodutores femininos e masculinos na mesma flor (Figura 1 - C, D e E). Os frutos são bagas globosas com diâmetro de 1,8 - 2,5 cm, de cor roxo-escuro e polpa doce (Figura 1 - F), podendo conter até 4 sementes em cada jabuticaba (Figura 1 - G). As sementes apresentam o eixo embrionário firmemente aderido ao cotilédone (Figura 1 - H) (LORENZI, 2011; LORENZI et al., 2006; LORENZI, 2000).

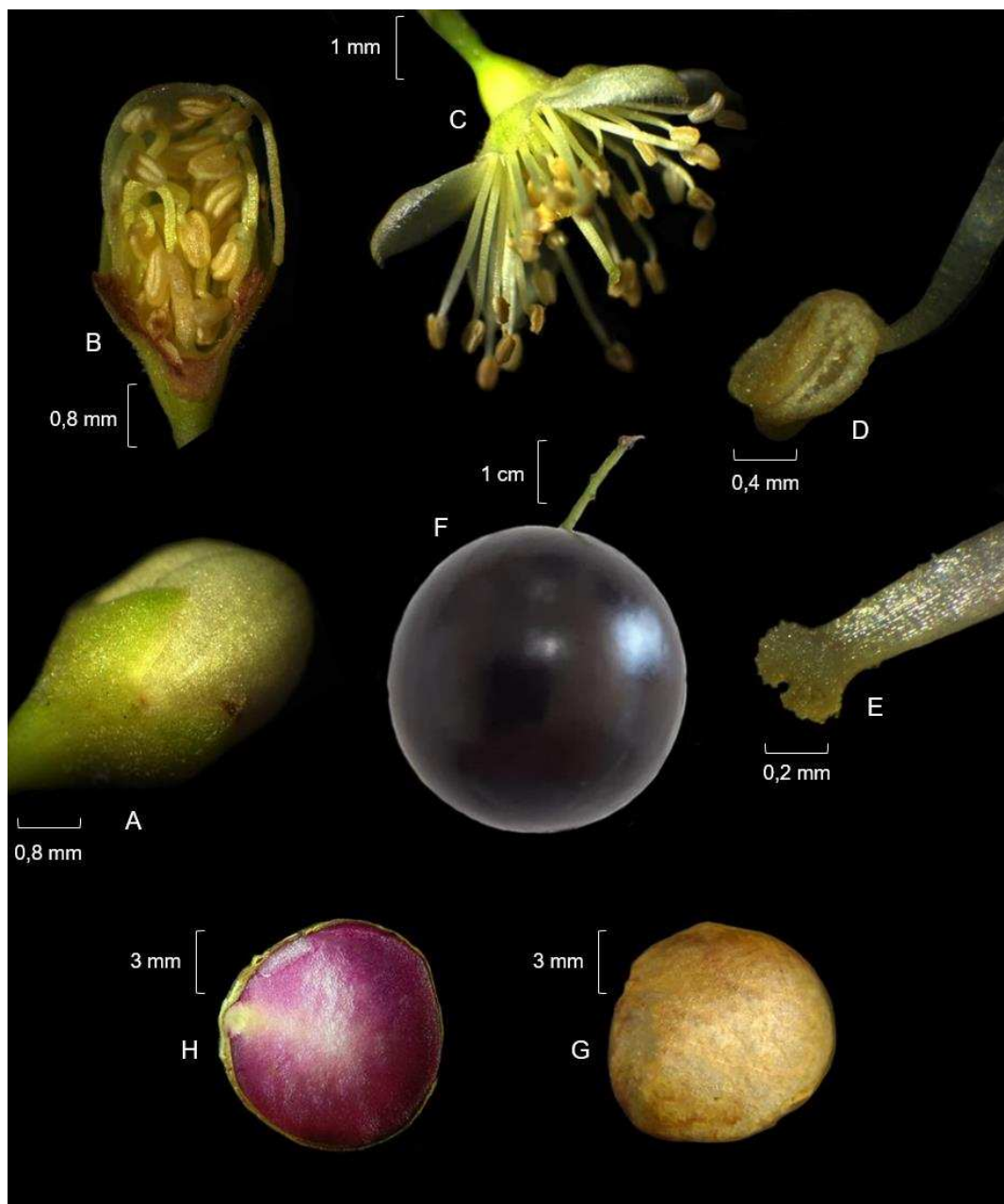


Figura 1. Aspectos da flor, fruto e semente de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts. **A.** Botão floral. **B.** Botão floral seccionado. **C.** Flor hermafrodita. **D.** Androceu (Filete e antera). **E.** Gineceu (Estigma e estilete) **F.** Fruto maduro. **G.** Semente. **H.** Semente dividida ao meio evidenciando o eixo embrionário aderido ao cotilédone (Fonte: De autoria própria).

3.2 O que torna a jabuticabeira promissora?

Estudos com frutíferas nativas do Brasil que apresentam valor econômico atual ou potencial, representam uma contribuição relevante na exploração de espécies nacionais com potencial medicinal (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011). Nos últimos anos houve um aumento nas publicações em relação as

atividades biológicas, perfil nutricional e fitoquímico das jabuticabeiras, o que evidencia seu grande potencial e a perspectiva de aumento na demanda para consumo de seus frutos. No momento, o maior entrave na comercialização de jabuticabas frescas é o pequeno tempo de durabilidade na pós-colheita, os frutos são altamente perecíveis e o tempo viável de comercialização é curto, por volta de dois ou três dias a temperatura ambiente, devido à rápida alteração da aparência decorrente da intensa perda de umidade, e da deterioração e fermentação da polpa (VIEITES et al., 2011).

A comercialização da jabuticaba no Brasil ocorre basicamente de três formas: a) Através da venda direta ao consumidor pelo dono da propriedade ou por meeiros de jabuticabas oriundas de extrativismo de plantas nativas; b) Através dos mercados atacadistas (Centrais de Abastecimento – Ceasa – e Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP); c) Comercialização associada ao turismo, na propriedade rural ou em festivais urbanos. Segundo técnicos e produtores, a demanda pela fruta vem crescendo, principalmente pela tendência da valorização de produtos tipicamente brasileiros e a gourmetização da jabuticaba já é uma realidade. Pode-se afirmar que, como o mirtilo, a amora e a framboesa, a jabuticaba vem se tornando uma fruta de nicho de mercado (WAGNER JÚNIOR et al., 2022).

De maneira geral, os frutos comestíveis possuem uma grande variedade de nutrientes clássicos, como carboidratos, sais minerais, aminoácidos e vitaminas. Embora alguns deles estejam presentes em baixas concentrações, eles podem ter um impacto significativo na saúde humana (WU et al., 2013). As jabuticabas são uma excelente fonte de minerais como cálcio, potássio, fósforo e magnésio (27,1 mg, 700,7 mg, 75,7 mg e 72,3 mg, respectivamente) (INADA et al., 2015). Níveis significativos de aminoácidos, como triptofano (1,0 mg) e lisina (7,0 mg), e menores quantidades de vitaminas B1 (0,04 mg), B2 (0,09 mg) e carotenóides totais (0,32 mg). Além disso, possui níveis de até 238 mg de ácido ascórbico (vitamina C) nas frutas. Os teores de proteínas e carboidratos chegam a 0,32 g e 12,58 g, respectivamente (RUFINO et al., 2011).

Além dos nutrientes clássicos, altas quantidades de antocianinas totais (195,78 mg) e polifenóis totais (1201,05 mg) são relatadas para as jabuticabeiras, sendo todos os valores citados representados para cada 100 g de frutas frescas

(MANNINO et al., 2020; RUFINO et al., 2011). Entre as frutas brasileiras, a jabuticaba é reconhecida como rica fonte de antocianinas, classe de flavonóides particularmente evidente em frutas escuras e com importantes propriedades antioxidantes (ALBUQUERQUE et al., 2020; PALOZI et al., 2019; ROMÃO et al., 2019).

A maioria dos estudos relacionados as atividades biológicas das jabuticabeiras, se referem a sua propriedade antioxidante e são realizados utilizando extratos obtidos do fruto. No entanto, ensaios *in vivo* e *in vitro* têm comprovado a eficácia do extrato obtido a partir de diferentes partes da planta, conferindo-lhes diferentes propriedades, a exemplo atividades citotóxica, anti-hipertensiva, anti-hiperglicêmica, antimicrobiana, anti-inflamatória e cardioprotetora (FIDELIS et al., 2021; ALBUQUERQUE et al., 2020; FIDELIS et al., 2020; ASSIS et al., 2019; PALOZI et al., 2019; ROMÃO et al., 2019; SOUZA-MOREIRA et al., 2019; ZHAO et al., 2019).

Gasparotto Júnior et al. (2019) compilou estudos etnobotânicos que descrevem o uso tradicional das jabuticabeiras, e indicam que os frutos são utilizados como alimento por comunidades urbanas, rurais e costeiras em vários estados brasileiros. O uso popular mais difundido da planta envolve o tratamento da diarreia, que utiliza as folhas, casca e fruto. Além disso, folhas e caules são popularmente usados tanto por infusão, decocção ou xaropes no tratamento de irritações cutâneas, hemorragia pélvica, feridas uterinas, corrimento vaginal, tosse, asma, dor de garganta e labirintite.

Os extratos naturais do fruto apresentam potencial aplicação na indústria alimentícia, estando de acordo com as tendências atuais de redução e reutilização de resíduos da agroindústria como aditivos alimentares naturais, com baixo custo, altamente antioxidantes e com aumento da vida útil dos alimentos. Além disso, há uma crescente preocupação por melhor qualidade de vida, e a incorporação de compostos bioativos em alimentos é uma excelente estratégia para promoção de saúde (FIDELIS et al., 2021; ALBUQUERQUE et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020; DI MAIO et al., 2019; BALDIN et al., 2018).

3.3 Propagação das jabuticabeiras

3.3.1 Propagação vegetativa convencional

O desenvolvimento de métodos de propagação por via vegetativa é de grande importância para a obtenção de mudas, e diversas técnicas são utilizadas, dentre elas a enxertia, mergulhia, alporquia, estaquia e micropropagação. Taxas de enraizamento moderadas a baixas são a principal limitação para a propagação vegetativa convencional das espécies de *Plinia* (BAPTISTA et al., 2020; SILVA et al., 2019; HOSSEL et al., 2018; CASSOL et al., 2017; CASSOL et al., 2015; MALAGI et al., 2012; FRANCO et al., 2010; SARTOR et al., 2010; SASSO et al., 2010a; SASSO et al., 2010b; DANNER et al., 2006; PEREIRA et al., 2005).

O percentual mínimo de enraizamento de estacas para produção comercial de mudas preconizado por Hartmann et al. (2011) é de 70%, e na literatura são encontrados percentuais variáveis e normalmente baixos de enraizamento de *Plinia* spp. (SILVA et al., 2019; SASSO et al., 2010b; SARTOR et al., 2010; PEREIRA et al., 2005). Há necessidade de ajustes na técnica de estaquia para aumentar os percentuais de enraizamento. Os baixos percentuais obtidos parecem estar correlacionados a idade do tecido, o tipo e a época de coleta das estacas, a presença ou ausência de reguladores de crescimento e as condições de cultivo das estacas.

A alporquia parece ser um método relativamente eficaz para formação de raízes adventícias em jaboticabeira, quando mediada pelo tratamento com AIB (CASSOL et al., 2015; SASSO et al., 2010a; DANNER et al., 2006). Para elaboração de um protocolo conclusivo para *Plinia* spp., novos estudos devem ser realizados, que contemplem o percentual de pega das mudas transplantadas, o período mínimo para o desligamento dos alporques da planta-mãe, a qualidade das raízes formadas, o intervalo de tempo entre o plantio das mudas no campo e o início da produção de frutos.

Para enxertia, até o momento, se obtém os melhores resultados de propagação vegetativa convencional para *Plinia* spp., com valores de pegamento que chegam até 90% (CASSOL et al., 2017; MALAGI et al., 2012; FRANCO et al., 2010; SASSO et al., 2010a). O acompanhamento por um longo período das mudas em campo, produzidas a partir da enxertia é necessário para que de fato seja constatada a compatibilidade. Além disso, ainda é preciso verificar o tempo

transcorrido da enxertia até o início da frutificação da muda enxertada e a evolução do crescimento no campo.

3.3.2 Propagação através da germinação *ex vitro* de sementes

O principal mecanismo de multiplicação das plantas vasculares ocorre a partir da germinação de sementes, que corresponde à reativação do metabolismo do embrião conduzindo ao aparecimento de uma nova planta (CARRERA-CASTAÑO et al., 2020). O desenvolvimento da semente é um evento complexo com inúmeros sistemas de controle e regulação, e dependente de fatores internos e/ou externos. Diferenças genéticas e fisiológicas bem como fatores ambientais afetam esse desenvolvimento, que pode não ser temporalmente uniforme mesmo que as plantas sejam cultivadas em ambientes idênticos (BAREKE, 2018).

Boas taxas de germinação são obtidas quando realiza-se a propagação das jabuticabeiras através do uso de sementes, porém as mudas obtidas não se desenvolvem de maneira sincrônica (HARTMANN et al., 2011). Além do longo período de juvenilidade, as sementes apresentam características de recalcitrância, ou seja, não sofrem secagem natural na planta matriz e são liberadas com elevado teor de umidade, que se for reduzido a um nível crítico, pode ocorrer à perda da viabilidade (HOSSEL et al., 2013).

O uso das sementes para obtenção das mudas de jabuticabeira traz vantagens que outras espécies com mesma característica não apresentam, como a poliembrionia, permitindo obter mais de uma plântula quando ocorre sua germinação. No entanto a poliembrionia não é exclusivamente vantajosa, como a massa média por embrião é reduzida, pode haver redução na emergência e sobrevivência dos embriões, além da competição entre as plântulas que pode dificultar o estabelecimento em relação a plântulas provenientes de sementes monoembriônicas (SOUZA FERREIRA et al., 2019).

Estudando o poder germinativo de sementes de *P. cauliflora* (Mart.) Kausel, Danner et al. (2011) relataram a viabilidade de preservação por até 5 dias de armazenamento, com maior emergência à temperatura ambiente (83,35%), em comparação com sementes armazenadas a 12°C e 6°C. As sementes perdem completamente a viabilidade com teor de água próximo a 10%. Quando as

sementes foram armazenadas a vácuo, com tampão fosfato, manteve razoável viabilidade (41,7%) por até 65 dias. Resultado semelhante foi encontrado por Hossel et al. (2013) com *P. peruviana*, em que o uso de vácuo permitiu uma maior emergência de mudas, em comparação com a ausência de vácuo no armazenamento.

Wagner Júnior et al. (2006b) avaliaram a germinação de sementes e a emergência de plântulas de *P. jaboticaba* (Vell.) Berg, *P. cauliflora* (Mart.) Kausel e *P. peruviana* (Poir.) Govaerts em quatro substratos. O processo de germinação das sementes não foi afetado pelos substratos utilizados. Porém, o uso da areia de forma isolada ou misturada ao substrato comercial Plantmax[®] proporcionou maior desenvolvimento das plantas. O efeito de diferentes substratos e temperaturas (20 e 30°C constantes; 20-30°C alternados) foi avaliado por Dias et al. (2011). A maior porcentagem de germinação foi observada com a areia (32,67%) e a mistura de solo, areia e esterco bovino (42%), enquanto a melhor temperatura de germinação (26,50%) foi de 30°C. Para Andrade e Martins (2003), a resposta mais favorável foi obtida em temperaturas mais baixas (15 e 20°C), atingindo até 76% de germinação.

A influência do tamanho da semente na germinação e desenvolvimento inicial de *P. jaboticaba* (Vell.) Berg e *P. peruviana* (Poir.) Govaerts foi avaliada por Wagner Júnior et al. (2011). As sementes foram classificadas quanto ao tamanho (<6 mm, 6-8 mm, >8 mm), sendo que as maiores apresentaram melhores resultados quanto ao comprimento total, altura da parte aérea, comprimento da raiz, número de folhas, número de mudas por semente e velocidade de germinação, além de atingir taxa de germinação de 100%. Resultados semelhantes foram relatados por Wagner Júnior et al. (2006a).

O pré-tratamento das sementes também pode auxiliar no processo de germinação. Rossa et al. (2010) avaliaram a germinação e a qualidade inicial de mudas de sementes de *P. peruviana* (Poir.) Govaerts submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos (sementes completamente limpas, sementes oxidadas com o fruto macerado, sementes com polpa e sementeadura do fruto com semente). As sementes completamente limpas ou com endocarpo aderido apresentaram os resultados mais promissores quanto à qualidade das mudas, bem como os melhores percentuais de germinação (98 e 85%, respectivamente), demonstrando a necessidade de tratamentos pré-germinativos para a espécie.

3.3.3 Propagação *in vitro*

3.3.3.1 Germinação de sementes

Através da germinação *in vitro* de sementes é possível alcançar altos percentuais de multiplicação, independente das condições climáticas, variações estacionais e de fatores bióticos, tais como agentes polinizadores, dispersores ou patogênicos (GENEROSO et al., 2019). O ambiente *in vitro* normalmente permite maior germinabilidade das sementes, possivelmente em função das condições de cultivo serem mais adequadas do que as condições de viveiro (AFONSO et al., 2018). Além disso, a germinação *in vitro* pode ser o primeiro passo para a obtenção de plantas assépticas, que podem ser utilizadas como fonte de propágulos para propagação *in vitro* (STEFENON et al., 2020; PARANHOS et al., 2017).

A influência de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura, na desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *P. jaboticaba* (Vell.) Berg foi avaliada por Picolotto et al. (2007). Neste caso, as sementes foram mantidas por oito dias à temperatura de 5°C e 25°C, após serem desinfestadas em hipoclorito de sódio nas concentrações de 2,5% e 5,0% e inoculadas em meio de cultura, sendo mantidas no escuro ou com fotoperíodo de 16h, e temperatura de 25 ± 2°C. Ainda o processo de germinação foi influenciado apenas pela temperatura, com porcentagem de germinação a 8% obtida quando as sementes foram mantidas a 25°C, considerada baixa se comparada a estudos de germinação *ex vitro* citados anteriores. A contaminação fúngica foi inversamente proporcional à concentração do desinfetante utilizado, sendo o hipoclorito de sódio a 5% mais eficiente na desinfestação fúngica.

A germinação *in vitro* de *P. jaboticaba* (Vell.) Berg também foi avaliada por Santos et al. (2019) usando meio de cultura MS líquido e semissólido. Antes da semeadura, as sementes foram tratadas por: a) imersão por 24 horas em água autoclavada; b) imersão por 24 horas em água autoclavada e uso de antibióticos na imersão, ou c) imersão por 24 horas em água autoclavada e uso de antibióticos no meio de cultura. A germinação teve início quatro dias após inoculação em meio líquido, sendo considerada precoce se comparada a estudos realizados por

Wagner Júnior et al. (2011) e Alexandre et al. (2006), que ocorreram aos vinte e cinco e vinte e sete dias (*P. jaboticaba* (Vell.) Berg e *P. peruviana* (Poir.) Govaerts) e aos dezoito dias para *Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg, respectivamente. A maior média de germinação (84%) foi obtida em meio líquido para as sementes embebidas por 24 horas em água autoclavada com antibióticos, além disso, todas as variáveis apresentaram médias superiores quando foi utilizado o meio líquido na ausência de antibiótico.

3.3.3.2 Embriogênese somática

A propagação vegetativa *in vitro* denominada micropropagação devido ao tamanho dos propágulos, é a aplicação mais eficiente da cultura de tecidos vegetais (GUPTA et al., 2020). Esta técnica é baseada no cultivo *in vitro* de fragmentos de plantas, denominados explantes, em condições assépticas onde todos os nutrientes necessários são disponibilizados à planta cultivada, a qual é mantida sob temperatura e períodos de luz-escuro controlados. Além do controle efetivo de doenças, apresenta facilidade no manuseio e transporte, independência da sazonalidade e utilização de pequenas porções da planta para produção em larga escala comercial (STEFENON, 2019). Estudos de micropropagação tornam-se relevantes e necessários, podendo ser aplicados para contornar os problemas de propagação vegetativa da jaboticabeira, de maneira a obter grande número de mudas em curto período.

A micropropagação está fundamentada no princípio da totipotencialidade celular, a qual se refere à capacidade das células vegetais para regenerar plantas completas através de divisões, crescimento e diferenciação, mesmo quando isoladas da planta que lhes deu origem (SU et al., 2021). Esta potencialidade das células vegetais indica que os genes responsáveis pela diferenciação de uma planta completa estão contidos nas células somáticas, e quando estas células são cultivadas em condições adequadas, esses genes voltam a se expressar e garantem a formação de novos órgãos e tecidos, possibilitando a obtenção de um organismo inteiro (FEHÉR, 2019). Dessa forma, as células de um explante, sob a ação de fatores específicos de crescimento presentes durante o cultivo *in vitro*, podem ser induzidas a expressar diferentes padrões morfogênicos. Como resultado

dessa expressão morfogênica, a micropropagação pode ser conduzida por meio da regeneração *in vitro* via organogênese e embriogênese somática, direta ou indiretamente (HARTMANN et al., 2011).

O controle quase absoluto do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das principais características da cultura de tecidos vegetais. O processo de organogênese e embriogênese somática é complexo, com atuação de múltiplos fatores internos e externos, como a constituição genética, presença de nutrientes (macro, micronutrientes e açúcar), fatores físicos (luz, temperatura, pH e concentrações de O₂ e CO₂) e, por fim, adição de algumas substâncias orgânicas (como reguladores de crescimento e vitaminas) (PENG et al., 2020). Desta maneira, aproximam-se as condições *in vitro* àquelas necessárias para que as plantas se desenvolvam no ambiente, como energia proveniente da luz, água, alimentos minerais, entre outros (TAIZ; ZAYGER, 2004).

A embriogênese somática (ES) é o processo pelo qual células somáticas, em condições adequadas, se diferenciam de maneira direta ou indireta em embriões somáticos e posteriormente conduzem a formação de uma planta completa (FERRARI et al., 2021). Na via direta os embriões somáticos originam-se a partir do explante sem a formação de estádios intermediários de calo, ou seja, as células já apresentam competência embriogênica e requerem uma reprogramação gênica mínima para a formação do embrião. Na via indireta os embriões são formados a partir de um calo, onde as células requerem uma reprogramação gênica maior para aquisição do estado de competência embriogênica (MENDEZ-HERNANDEZ et al., 2019; HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017).

Os embriões somáticos são estruturas bipolares, sem conexão vascular com o tecido do explante inicial e apresentam órgãos típicos de embriões zigóticos (radícula, hipocótilo e cotilédones), além dos 4 estágios característicos de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) (PENG et al., 2020). A ES visa a propagação clonal em larga escala de espécies difíceis de propagar por técnicas convencionais (KUMAR; VAN STADEN, 2017), podendo servir também como modelo para estudar sistemas subjacentes à embriogênese, como os eventos moleculares, morfológicos, bioquímicos, fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento (STEFENON et al., 2020).

Além disso, a ES pode ser aplicada em produção de sementes sintéticas, criopreservação, biorreatores, transformação genética e estabelecimento de bancos de germoplasma (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006; GIRI et al., 2004). Há algumas limitações inerentes à técnica de ES, a exemplo a produção assíncrona de embriões, baixa taxa de conversão de plantas, recalcitrância de algumas espécies vegetais e ocorrência de mutações (variação somaclonal) (STEFENON et al., 2020; HORSTMAN; BEMER; BOUTILIER, 2017; SHAHZAD; SHARMA; SIDDIQUI, 2016).

A transição de células somáticas para embriogênicas compreende dois estádios: indução embriogênica, formado pelas etapas de desdiferenciação, expressão da totipotência e determinação; e o estágio de desenvolvimento, caracterizado pela expressão do programa embriogênico e o consequente desenvolvimento completo do embrião (ELHITI; STASOLLA, 2016; ISAH, 2016; MAHDAVI-DARVARI; NOOR; ISMANIZAN, 2014; FEHÉR, 2005). De acordo com Jiménez (2001) essas fases aparentam ser independentes uma da outra e controladas por diferentes fatores. Nesses estádios, genes ativos em células somáticas são suprimidos, ao passo que, genes necessários para a embriogênese são ativados (MAHDAVI-DARVARI; NOOR; ISMANIZAN, 2014).

A técnica da ES foi aplicada com sucesso em algumas espécies da família Myrtaceae, a exemplo para *Acca sellowiana* (Berg) Burret que tornou-se referência nos estudos de ES em plantas lenhosas com características recalcitrantes (FRAGA et al., 2012; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2014, 2007b, 2004; STEFANELLO et al., 2005; GUERRA et al., 2001; CANHOTO; CRUZ, 1994, 1996a, 1996b; CRUZ et al., 1990;), *Myrciaria aureana* Mattos (MOTOIKE et al., 2007), *Myrtus communis* L. (CANHOTO et al., 1999), *Psidium guajava* L. (BAJPAI et al., 2016; AKHTAR, 2010; RAI et al., 2007) e *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (OLIVEIRA et al., 2022).

De nosso conhecimento, há apenas um estudo publicado de embriogênese somática para espécie *P. peruviana* a partir de sementes maduras divididas ao meio (contendo um cotilédone e um embrião resultante da fecundação). Foram testados na indução da ES diferentes concentrações de 2,4-D (2,5; 5; 10; 25; e 50 μM) e glutamina (0; 250; 500; 750 e 1000 mg L^{-1}), e o melhor tratamento foi o meio MS com 1000 mg L^{-1} de glutamina e 10 μM de 2,4-D com percentual de formação de 37,5%, não diferindo significativamente dos demais tratamentos. Durante a

etapa de maturação testou-se a suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de PEG 6000 (30, 60 e 90 g L⁻¹), no qual 60 g L⁻¹ foi suficiente para promover o avanço nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos, em contrapartida não houve sucesso na conversão dos ES em plântulas (SILVEIRA et al., 2020).

Para indução da ES a partir de explantes obtidos de sementes maduras de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel, foram testados concentrações de 2,4-D (5; 10 e 15 µM) por 60 dias de exposição. O maior percentual de embriões somáticos obtidos foi com o uso de 15 µM, no entanto houveram algumas anormalidades morfológicas (cotilédones fundidos ou formação de múltiplos cotilédones) e anatômicas (zonas de cicatrização com acúmulo de compostos fenólicos e morte celular), possivelmente devido ao longo período de exposição ao 2,4-D. Além disso, não houve conversão (OLIVEIRA et al., 2022).

3.3.3.3 Calogênese

Os calos obtidos *in vitro* são caracterizados por um arranjo de células, não sendo considerado um órgão com tecidos executando funções específicas, mas sim, um sistema com gradientes nutricionais e de fitorreguladores (GOLLE et al., 2020). Em resposta a determinados estímulos, centros meristemáticos do tecido calogênico, tanto através do cultivo em meio de cultura líquido quanto sólido, podem diferenciar-se originando raízes, brotos ou embriões somáticos (NEUMANN et al., 2009). Segundo Alves et al. (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.

Stefenon et al. (2020) estudaram a calogênese *in vitro* de *Eugenia uniflora* L. visando a indução da embriogênese somática. Foram utilizados como fonte de explantes segmentos nodais, radiculares e discos foliares obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro*, sendo testadas oito combinações diferentes de auxinas (2,4-D ou ANA) e citocininas (BAP ou TDZ). A melhor resposta calogênica foi observada em segmentos nodais seguido por discos foliares, e os calos de segmentos nodais cultivados em meio MS com ANA (10 µM) + TDZ (5 µM)

originaram estruturas putativas pró-embriogênicas, revelando competência para indução e desenvolvimento da embriogênese somática.

O uso de reguladores de crescimento e a posição de explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. foi avaliado por Golle e Reiniger (2013), visando a indução da calogênese. Utilizou-se o meio de cultura MS acrescido de 10 μM de ANA isolado ou duas combinações de 2,4-D e BAP: 5 - 5 μM e 5 - 10 μM , respectivamente. A posição dos explantes afetou a calogênese e a organogênese em segmentos foliares de *E. involucrata*, sendo mais adequada a posição abaxial e sem cortes na região do limbo. A associação dos reguladores de crescimento 2,4-D + BAP na concentração de 5 – 10 μM foi mais promissora para a obtenção de calos, especialmente os nodulares, putativos à embriogênese somática.

3.4 Análises anatômicas e ultraestruturais

Análises anatômicas e ultraestruturais vêm sendo desenvolvidos em diversas espécies com o objetivo de caracterizar o processo e as vias de regeneração de plantas *in vitro* (BARRACO et al., 2014; DIBAX et al., 2010). Estudos histológicos podem ser realizados para a verificação e confirmação da via de regeneração, diferenciando a organogênese da embriogênese somática (VIEIRA; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2001). Caracterizando-se a via de regeneração, é possível melhorar as condições de cultivo, para o estabelecimento de protocolos eficientes na indução e conversão de plantas. Através de cortes histológicos é possível a observação do desenvolvimento de gemas adventícias ou de embriões somáticos, e a definição da origem direta ou indireta. Tais resultados permitem caracterizar possíveis alterações celulares e definir as regiões do explante com potencial morfogênico (MONTEIRO, 2000).

A microscopia eletrônica de varredura, vem sendo utilizada em vários estudos de organogênese e embriogênese somática, com o intuito de fornecer maiores detalhes da morfologia externa durante o desenvolvimento *in vitro* (NOGUEIRA et al., 2007; APPEZZATO-DA-GLÓRIA MACHADO, 2004). É possível diferenciar as estruturas formadas, o processo de regeneração e a caracterização dos estágios embriogênicos em globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar

(NOGUEIRA, 2006), sendo possível verificar também a formação anormal de embriões somáticos (PESCADOR et al., 2008).

Para família Myrtaceae, existem estudos que correlacionam os eventos do cultivo *in vitro* com análises histológicas e/ou ultraestruturais, com as espécies *Acca sellowiana* (Berg) Burret (PESCADOR et al., 2008; CANHOTO; GUERRA et al., 2001; CRUZ, 1996; CANHOTO et al., 1996; CRUZ et al., 1990), *Myrciaria aureana* Mattos (MOTOIKE et al., 2007), *Psidium guajava* L. (BAJPAI et al., 2016) e *Eugenia uniflora* L. (STEFENON et al., 2020). Para *Plinia peruviana* há apenas um estudo publicado realizado por Silveira et al. (2020), referente a análises anatômicas de calos não embriogênicos e embriogênicos durante o desenvolvimento *in vitro*.

Silveira et al. (2020) utilizaram, como explantes, folhas jovens e sementes maduras de *P. peruviana* para iniciar o processo de indução da embriogênese somática *in vitro*. As análises histológicas dos calos formados a partir dos discos foliares mostrou uma aparência compacta com características não embriogênicas, com células parenquimáticas grandes, desorganizadas e vacuoladas. Em contraste, os calos originados de sementes maduras apresentavam estrutura friável de coloração amarelada ou marrom, e desenvolveram massas pró-embriogênicas (MPEs), com células pequenas e redondas com pouca vacuolização, características de estruturas embriogênicas sendo semelhante à dos meristemas e zigotos. Além disso, as MPEs mostraram tecidos vasculares sem conexões com o explante materno, e espessamento típico das paredes celulares dos elementos de células traqueais, sendo possível diferenciar as calosidades e MPEs a partir de análises histológicas.

REFERÊNCIAS

- AFONSO M. V.; PARANHOS, J. T.; TABALDI, L. A.; SORIANI, H. H. Germinação *in vitro* de sementes e parâmetros morfofisiológicos de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Iheringia**, Série Botânica, v. 73, n. 1, p. 39-45. 2018. DOI: DOI 10.21826/2446-8231201873105
- ALBUQUERQUE, B. R.; PINELA, J.; BARROS, L., M.; BEATRIZ, P. P.; OLIVEIRA, B. P. P.; FERREIRA, C. F. R. I. Anthocyanin-rich extract of jaboticaba epicarp as a natural colorant: Optimization of heat- and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. **Food Chemistry**, p. 316. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126364>
- 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, n. 2, p. 227-230. 2006.
- ALMEIDA-TEIXEIRA, G. H.; BERLINGIERI DURIGAN, M. F.; DURIGAN, J. F. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. [Myrtaceae]). In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits**, New Dehli: Woodhead Publishing, p. 246-274. 2011.
- 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, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180. 2000.
- ANDRADE, R. A.; MARTINS, A. B. G. Influência da temperatura na germinação de sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, p. 197-198. 2003.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S. R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 429-437. 2004.
- ASSIS, P. M.; DUTRA, R. C.; AMARANTE, C.; CHAVES, M. A. M.; MOREIRA, C.; BRANDÃO, M.; RAPOSO, N. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: toxicological assays, biological activities, and elemental analysis of organic compounds. **Natural Product Research**, v. 35, n. 10, p. 1727-1731. 2019.
- AKHTAR, N. Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 556-562. 2010.

BAJPAI, A.; KALIM, S.; CHANDRA, R.; KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-12. 2016.

BALDIN, J.C. et al. Effect of microencapsulated Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract on quality and storage stability of mortadella sausage. **Food Research International**. v. 108, p. 551-557. 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.03.076.

BAPTISTA, J. O.; LOPES, J. C.; SCHMILDT E. R.; ARAUJO C. P.; ALEXANDRE, R. S. Grafting methods and use of fasteners in monoembryonic, polyembryonic, and multi-stemmed jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell) Berg) seedlings. **Comunicata Scientiae**, v.11: e3158. 2020.

BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; COLLIN, M.; ESCOUTE, J.; LARTAUD, M.; VERDEIL, J. L.; ENGELMANN, F. Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulationdehydration. **Protoplasma**, v. 251, p. 177-189. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0536-5>

CARRERA-CASTAÑO, G.; CALLEJA-CABRERA, J.; PERNAS, M.; GÓMEZ, L.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. An updated overview on the regulation of seed germination. **Plants**. v. 9, n. 6, p. 703. 2020. DOI: [doi:https://doi.org/10.3390/plants9060703](https://doi.org/10.3390/plants9060703)

BAREKE, T. Biology of seed development and germination physiology. **Advances in Plants & Agriculture Research**. v. 8, n. 4, p. 336-346. 2018. DOI: [doi:10.15406/apar.2018.08.00335](https://doi.org/10.15406/apar.2018.08.00335)

BERG, O. C. Myrtaceae. In: Martius CPF (Ed.) **Flora Brasiliensis**. v. 14, p. 1–528. 1857.

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

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

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

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

OLIVEIRA, F. L. R.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; FRAGA, H. P. F.; DEGENHARDT, J.; QUOIRIN, M. Embryogenic cultures and somatic embryos development from mature seeds of jaboticaba (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel).

Anais Da Academia Brasileira De Ciências, v. 94, n. 4. 2022.
<https://doi.org/10.1590/0001-3765202220201073>

CEAGESP. **Jaboticaba**. 2017. Acesso em agosto de 2020.
<http://www.ceagesp.gov.br/guia-ceagesp/jaboticaba/>

CASSOL, D. A.; WAGNER JÚNIOR, A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I. Embalagem, época e ácido indolbutírico na propagação de jaboticabeira por alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 267-272. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-2945-011/14>

CASSOL, D. A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I.; MAZARO, S. M.; WAGNER JÚNIOR, A. Grafting technique and rootstock species for the propagation of *Plinia cauliflora*. **Ciência Rural**, v. 47, n. 02, e20140452. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140452>

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343-656. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010000200001>

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

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES 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**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 530-532. 2006.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; AMBROSIO, R.; WAGNER JÚNIOR, A. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 246-252. 2011. DOI: [10.1590/S0100-29452011005000037](https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000037)

DI MAIO, C.; PITTIA, P.; MAZZARINO, L.; MARASCHIN, M.; KUHNEN, S. Cow milk enriched with nanoencapsulated phenolic extract of jaboticaba (*Plinia peruviana*). **J Food Science and Technology**, v. 56, n. 3. p. 1165–1173. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03579-y>

DIAS, M. A.; LOPES, J. C.; SOUZA NETO, J. D.; HEBERLE, H. Influência da temperatura e substrato na germinação de sementes de jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). **Idesia (Chile)**, v. 29, n.1, p. 23-27. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292011000100004>

DIBAX, R.; QUISEN, R. C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant Regeneration from Cotyledonary Explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and Histological Study of

Organogenesis *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 311-318. 2010.

ELHITI, M.; STASOLLA, C. Somatic embryogenesis: the molecular network regulating embryo formation. In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, p. 217-229. 2016.

FEHÉR, A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 536. 2019. DOI: doi:10.3389/fpls.2019.00536

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1849, n. 4, p. 385-402. 2015.

FERRARI, I. F.; MARQUES, G. A.; JUNIOR, W. L. S.; BIAZOTTI, B. B.; PENA PASSOS, M.; DE ALMEIDA, J. A. S.; MONDEGO, J. M. C.; MAYER, J. L. S. Comparative ontogenesis of *Coffea arabica* L. somatic embryos reveals the efficiency of regeneration modulated by the explant source and the embryogenesis pathway. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. v. 57, n. 5, p. 796-810. 2021. DOI: doi:10.1007/s11627-021-10200-

FIDELIS, M. et al. Polyphenols of jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O.Berg] seeds incorporated in a yogurt model exert antioxidant activity and modulate gut microbiota of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Food Chemistry**, p. 334. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127565>

FIDELIS, M. et al. Response surface optimization of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] O.Berg) seeds: Antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic, antihypertensive and cytotoxic assessments. **Food and Chemical Toxicology**, p.142. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111et9>

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

FRANCO, L. R. L.; SILVA, J. F.; MAIA, V. M.; LOPES, P.S.; AMORIM, I. J. F.; MIZOBUTSI, E. H. Pegamento e crescimento inicial de mudas de jaboticabeiras 'açú' e 'sabará' submetidas a dois tipos de enxertia. **Revista Ceres**, v. 57, n. 4, p. 535-538. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2010000400016>

GASPAROTTO JUNIOR, A.; SOUZA, P.; LÍVERO, F. A. R. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: A comprehensive ethnopharmacological review of a genuinely Brazilian species. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 245. 2019.

GENEROSO, A. L.; VIANA, A. P.; CARVALHO, V. S.; JÚNIOR, C. *In vitro* germination to overcome dormancy in seeds of 'Red Globe', 'Italia' and 'Niagara

Rosada'grapes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 5, p. 1-6. 2019. DOI: DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452019495>

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

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

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, S. M.; SERROTE, C. M. L. Fitorreguladores na calogênese e rizogênese em *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 40, e201901908, p. 1-9. 2020. DOI: <http://doi.org/10.4336/2020.pfb.40e201901908>

GOVAERTS, R, et al. World Checklist of Myrtaceae. Kew Publishing, **Royal Botanic Gardens**, Kew, p. 1-455. 2008.

GOVAERTS, R., et al. **World checklist of Myrtaceae**. Local: Royal Botanic Gardens, Kew. p. 455. 2019. Disponível em: <http://wcsp.science.kew.org/> Retrieved.

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

GUPTA, N.; JAIN, V; JOSEPEH, M.R.; DEVI, S. A Review on Micropropagation Culture Method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, India, v. 8, n. 1, p. 86-93. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653>

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Propagation: principles and practices**. Publishing company Prentice Hall, 8. ed. New Jersey. 2011.

HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Wiley Regeneration**, v. 4, n. 4, p. 201-216. 2017.

HOSSEL, C.; OLIVEIRA, J. S. M. A.; FABIANE, K. C.; WAGNER JÚNIOR, A.; CITADIN, I. Conservação e teste de tetrazólio em sementes de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n.1, p. 255-261. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000100029>

HOSSEL, C.; WAGNER JÚNIOR, A.; HOSSEL, J. S. A. O.; FABIANE, K. C.; DALLAGO, A. Rooting of jaboticabeira of cabinho mini-cuttings (*Plinia trunciflora*). **Comunicata Scientiae**, v.9, n. 4, p. 613-620. 2018. DOI: 10.14295/CS.v9i4.2737

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n. 1, p. 422-433. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>

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

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 2, 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 3, 1 ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2011.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2006.

MALAGI, G.; CITADIN, I.; SCARIOTTO, S.; WAGNER JÚNIOR, A.; SACHET, M.R. Enxertia interespecífica de jaboticabeira: influência do tipo de garfo. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 221-224. 2012. DOI: 10.1590/S0103-84782012005000006

NEUMANN, K. H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture – a toll in biotechnology: basics and application**. Berlin: Springer Verlag. p. 333. 2009.

NOGUEIRA, R. C. **Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. Dissertação (Agronomia/Fisiologia vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 50. 2006.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 48-50. 2007.

PALOZI, R. A. C. et al. Pharmacological safety of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel in rabbits. **Toxicology Reports**, v.6, p. 616-624. 2019. DOI: 10.1016/j.toxrep.2019.06.017

PARANHOS, J. T.; LÖBLER, L.; CECHIN, J., FERNANDES, T. S., FAO, E.; SORIANI, H. H. PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Casearia sylvestris* SWARTZ (SALICACEAE). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 4, p. 1191-1199. 2017 . DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509830301>

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

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

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J., FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, v. 8, n.1, p. 19-23. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v8i1.8337>

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOVOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant propagation by tissue culture**, v. 86, p. 285-301. 2006.

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

ROMÃO, P. V. M.; PALOZI, R.; GUARNIER, L. P.; SILVA, A. O.; LORENÇONE, B. R.; NOCCHI, S. R.; MOURA, C.; LOURENÇO, E.; SILVA, D. B.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Cardioprotective effects of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel in a rabbit model of doxorubicin-induced heart failure. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 242, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112042>

SANTOS, D. S.; OLIVEIRA, L. O.; BEISE, D. C.; MACHADO, L. O.; STEFENON, V. M. Biotechnology in *Plinia* spp. needs and perspectives for a neglected group of fruit species. **Biotecnología Vegetal**, v. 21, n. 1, p. 3 – 14. 2021.

SANTOS, S. K.; LUNA, N.P.; DA COSTA JÚNIOR, O.; DIAS, M.; GOMES, D.; FONSECA, K. Germination *in vitro* of Jabuticabeira *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 35, n. 6, p.1-8. 2019. DOI: <https://doi.org/10.9734/jeai/2019/v35i630221>

SARTOR, F. R.; MÜLLER, N. T. G.; MORAES, A. M. Efeito do ácido indolbutírico e de substratos na propagação de estacas e sementes de jabuticabeira. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 4, n. 3, p. 11-15. 2010.

SASSO, S. A. Z. **Propagação vegetativa de jabuticabeira**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco – RS, p.64. 2009.

SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jabuticabeira por enxertia e alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 571-576. 2010a. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000055>

SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jabuticabeira por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n.2, p. 577-583. 2010b. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000054>

SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; SIDDIQUI, S. A. Somatic Embryogenesis: A Valuable Strategy for Phyto-Climbing Diversity Conservation. In: SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; SIDDIQUI, S. A. (Eds.). **Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers**. New York: Springer, p. 195-216. 2016.

SILVA, C. P.; LACERDA, E. G.; SANCHES, L. F. J.; QUEIROZ, J. O.; MARCHIOTTI, R. C. B. Enraizamento de estacas de Jabuticabeira tratadas com ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA). **Revista Agrária Acadêmica**, v. 2, n. 3, p. 122-132. 2019. DOI: [10.32406/v2n32019/122-132/agrariacad](https://doi.org/10.32406/v2n32019/122-132/agrariacad)

SILVEIRA, S.S.; SANTOS, B.F.S.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from mature split seeds of jaboticaba (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts). **Acta scientiarum**, v. 42, n. 1, e43798. 2020. DOI: [10.4025/actasciagron.v42i1.43798](https://doi.org/10.4025/actasciagron.v42i1.43798)

SOBRAL, M. Adoxaceae. In: **Lista de espécies do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB004253>

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

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

SOUZA FERREIRA, D. N. DE; CAMARGO, J. L. C.; FERRAZ, I. D. K. Do polyembryonic seeds of *Carapa surinamensis* (Meliaceae) have advantages for seedling development? **Acta Amazonica**, v. 49, p. 97-104. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201801211>

STEFENON, V. M. **Micropropagation: Methods and Effects**. Ed. Nova Science Publishers, Inc. New York. 2019.

STEFENON, V.M.; PINHEIRO, M.V.M.; FREITAS, F.R.; SILVA, V.J.B.; VIEIRA, P.B.; SANTOS, D.D; GUERRA, M.P. In vitro callogenesis for the induction of somatic embryogenesis and antioxidant production in *Eugenia uniflora*. **Biotecnología Vegetal**, v. 20, n. 2, p.135-146. 2020.

STEFENON, V. M.; FREITAS, F. R.; PINHEIRO, M. V. M.; GOETEN, D.; STEINER, N.; GUERRA, M. P. . Advances and constraints in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia*, *Acca sellowiana*, and *Bactris gasipaes*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 143, p. 1928. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01928-w>

SU, Y. H.; TANG, L.P.; ZHAO, X.Y.; AND ZHANG, X.S. Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, p. 228–240. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jipb.12972>

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159. 2013.

YIL, J. Y.; SYLVESTRE, I.; COLIN, M.; SALMA, M.; LEE, S. Y.; KIM, H. H.; ... & ENGELMANN, F. Improved cryopreservation using droplet-vitrification and histological changes associated with cryopreservation of Madder (*Rubia akane* Nakai). **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 30, n. 1, p.79-84. 2012.

LIMA, A. P. P. S.; BASTOS, F. J. O.; LIMABRITO, A.; FERNANDES, G. B.; SANTANA, J. R. F. Modulação do meio de cultura na conservação *ex situ* de *Neoregelia mucugensis* Leme (Bromeliaceae). **Revista Caatinga**, v. 34, n. 4. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252021v34n403rc>

MAHDAVI-DARVARI, F.; NOOR, N. M.; ISMANIZAN, I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 2, p. 407-422. 2014.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 2: técnicas de produção e mercado: feijoa, figo-da-índia, fruta-pão, jaca, lichia, mangaba**. Editora Cinco Continentes. Porto Alegre, RS. p. 241. 2002.

MANNINO, G.; PERRONE, A.; CAMPOBENEDETTO, C.; SCHITTONI, A.; MARGHERITA BERTEA, C.; GENTILE, C. Phytochemical profile and antioxidative properties of *Plinia trunciflora* fruits: A new source of nutraceuticals. **Food Chemistry**, 2020. DOI: [10.1016/j.foodchem.2019.125515](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125515)

MENDEZ-HERNANDEZ, H.A.; LEDEZMA-RODRIGUEZ, M.; AVILEZ-MONTALVO, R.N.; JUAREZ-GOMEZ, Y.L.; SKEETE, A.; AVILEZ-MONTALVO, J.; DE-LA-PENA, C.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 77, 2019. DOI: [doi:10.3389/fpls.2019.00077](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077)

MONTEIRO, A. C. B. **Cultivo in vitro de três espécies do gênero *Passiflora***. Piracicaba, p. 82, Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul**. Brasília. 2011.

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

RODRIGUES, M.A.V. et al. Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jaboticaba peel: Rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 769–779. 2020.

ROSSA, Ü. B.; TRICHES, G. P.; GROSSI, F.; NOGUEIRA, A. C.; REISSMANN, C. B.; RAMOS, M. R. Germinação de sementes e qualidade de mudas de *Plinia trunciflora* (jaboticabeira) em função de diferentes tratamentos pré germinativos. **Floresta**, v. 40, n. 2, p. 371-378. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/ufv.v40i2.17832>

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, v. 44, p. 2072–2075. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.002>.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. 2. ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa. 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SEVERI, J. A.; RODRIGUES, E. R.; PAULA, M. I.; FREITAS, J. A.; VILEGAS, W., PIETRO, R. C. L. R. Flavonóides de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) com atividade antifúngica. **Natural Product Research**, v. 33, n.17, p. 2579-2582. 2019. DOI: 10.1080 / 14786419.2018.1460827

TAIZ, L.; ZAYGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed. p.119. 2004.

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

VIEITES, R. L.; DAIUTO, E.R.; MORAES, M.R.; NEVES, L.C.; CARVALHO, L.R. Caracterização físico-química, bioquímica e funcional da jaboticaba armazenada sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 362-375. 2011.

VIEIRA, M. L. C. e APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I.S. e VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 911-938. 2001.

STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Embriogênese somática de tecidos florais de feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 117–126. 2005.

WAGNER JÚNIOR, A.; FRANZON, R. C.; SILVA, J. O. C.; SANTOS, C. E. M.; GONÇALVES, R. S.; BRUCKNER, C. H. Effect of temperature on germination of seeds of three species of jaboticabeira. **Ceres Journal**, v. 54, n. 314, p. 345-350. 2006b.

WAGNER JÚNIOR, A.; SILVA, J. O. C.; PIMENTEL, L. D.; NEGREIROS, J. R. S.; ALEXANDRE, R. S.; MORGADO, M. A. D.; ÁLVARES, V. S.; BRUCKNER, C. H. Germinação e emergência de três espécies de jaboticabeira em quatro substratos. **Revista Ceres**, v.53, n. 307, p. 322-327. 2006a.

WAGNER JÚNIOR, A.; SILVA, J. O. C.; PIMENTEL, L. D.; SANTOS, C. E. M.; BRUCKNER, C. H. Germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de jaboticabeira em função do tamanho de sementes. **Acta Scientiarum**, v. 33, n. 1, p. 105-109. 2011. DOI: 10.4025/actasciagron.v33i1.4881

WAGNER JÚNIOR, A.; DANNER, M. A.; CITADIN, I. **Jaboticabeiras**. 1. ed -- Curitiba, PR: EDUTFPR, 2022. ISBN: 978-65-88596-53-1

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

KAUSEL, V. E. Beitrag zur Systematik der Myrtaceen. In: Kausel, VE. **Arkiv för Botanik**, p. 491-516. Almqvist & Wikssels Boktryckeri Ab, 3. ed., Estocolmo. 1956.

ZHAO, D. J. et al. Jaboticabin and Related Polyphenols from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) with Anti-inflammatory Activity for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 1513-1520. 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b05814

Biotechnology in *Plinia* spp. needs and perspectives for a neglected group of fruit species

Daniele Damian dos Santos¹ <https://orcid.org/0000-0002-3795-1796>

Luana Oliveira de Oliveira¹ <https://orcid.org/0000-0001-7472-4149>

Dalvan Carlos Beise² <https://orcid.org/0000-0001-8638-7004>

Lilian de Oliveira Machado² <https://orcid.org/0000-0002-4172-2283>

Valdir Marcos Stefenon^{1,2*} <https://orcid.org/0000-0003-1091-700X>

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa. Av. Antonio Trilha 1847. São Gabriel. RS. Brazil. 97300-162

²Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga 1346. Florianópolis. SC. Brazil. 88034-000

*Corresponding author e-mail: valdir.stefenon@ufsc.br

ABSTRACT

Plinia species comprise a group of underrated fruit trees native to the South and Central American neotropics. Their fruits have high potential as a nutraceutical food and to the medicinal industry. However, among the 80 accepted species, less than a dozen are cultivated. In this review, the state-of-the-art of the genetic diversity and the techniques of vegetative propagation of *Plinia* spp. was updated. Therewith, it is intended to encourage further studies for genetically disentangle the taxonomic classification the species, and the development of propagation protocols towards the establishment of commercial plantations. Establishing commercial orchards of *Plinia* species may open new markets for this fruit crop, but the absence of breeding programs and superior quality seedlings hinder such endeavors. The main outcomes of this study are the need of using molecular approaches for solving the taxonomic uncertainties among *Plinia* species and micropropagation protocols to overcome the difficulties concerning to the vegetative propagation of this species.

Keywords: biotechnology, jaboticabeira, micropropagation, molecular taxonomy, morphological diversity, vegetative propagation

Biotecnología en *Plinia* spp. necesidades y perspectivas para un grupo desatendido de especies frutales

RESUMEN

Las especies de *Plinia* comprenden un grupo subestimado de árboles frutales nativos de los neotrópicos de América del Sur y Central. Sus frutos tienen un alto potencial como alimento nutracéutico y para la industria medicinal. Sin embargo, entre las 80 especies aceptadas, se cultivan menos de una docena. En esta revisión, se actualizó el estado del arte de la diversidad genética y las técnicas de propagación vegetativa de *Plinia* spp. Con ello, se propondrá impulsar nuevos estudios para dilucidar genéticamente la clasificación taxonómica de la especie y el desarrollo de protocolos de propagación hacia el establecimiento de plantaciones comerciales. El establecimiento de plantaciones comerciales de especies de *Plinia* puede abrir nuevos mercados para este cultivo de frutas, pero la ausencia de programas de mejoramiento genético y plántulas de calidad superior obstaculizan tales esfuerzos. Los principales resultados de este estudio son la necesidad de utilizar enfoques moleculares para resolver las incertidumbres taxonómicas entre las especies de *Plinia* y los protocolos de micropropagación para superar las dificultades relacionadas con la propagación vegetativa de esta especie.

Palabras clave: biotecnología, diversidad morfológica, jaboticabeira, micropropagación, propagación vegetativa, taxonomía molecular

INTRODUCTION

Jaboticabeira is the popular name of different species of the genus *Plinia* L. (Myrtaceae), native to the South and Central American neotropics (Figure 1 A). The main characteristic of these trees (Figure 1 B) is the development of flowers and fruits (popularly known as jaboticaba) over the wood trunk and main stems (Figure 1 C-D), a feature known as cauliflory. Reproductive buds of *Plinia* initiate from vascular cambium cells through cell division followed by an increase in the size of the meristematic region from the vascular cambium toward both the bark and the xylem, keeping the connection with vessel elements (Oliveira *et al.*, 2019).

Fruits are produced once or twice a year, eventually up to three times, depending on climatic conditions and the management adopted. In *Plinia jaboticaba*, it seems that inflorescence sprouting is stimulated by low temperatures and water deficit (Oliveira *et al.*, 2019). The fruits have economic potential both for fresh consumption and in the food and pharmaceutical industries. They present a wide variety of classic nutrients and components capable of providing positive physiological effects on health (Teixeira *et al.*, 2008; Rufino *et al.*, 2011). They also have recognized antioxidant properties, protecting from damages caused by free radicals, preventing or postponing the onset of cardiovascular, chronic, and neurodegenerative diseases (Pitz *et al.*, 2017).



Figure 1. (A) Distribution of *Plinia* species in neotropical South and Central America according to the Plants of the World platform (www.plantsoftheworldonline.org). CU: Cuba, HA: Haiti, SD: San Domingo, BZ: Belize, GU: Guatemala, HO: Honduras, CR: Costa Rica, PN: Panamá, CO: Colombia, VE: Venezuela, GU: Guyana, SU: Suriname, EQ: Ecuador, PE: Peru, BO: Bolivia, BR: Brazil, PY: Paraguay, AR: Argentina, UR: Uruguay. (B) Adult tree of *Plinia peruviana*, growing in an urban backyard. (C) Flowers growing along the tree stem. (D) Rip fruits along the tree stem.

In this context, this review aims at updating the state-of-the-art of the taxonomic and genetic diversity and the techniques of vegetative propagation of *Plinia* spp. Therewith, it is intended to encourage the development of further studies for genetically disentangle the taxonomic classification of the *Plinia* species, and the development of propagation protocols towards the establishment of commercial plantations, attempting the market valuation of the fruit.

Expanding genetic and genomic analyses are needed to disentangle the subtle inter-species morphological differences

The jaboticabeiras were firstly taxonomically described into genus *Myrtus* Tourn ex. L. and *Guapurium* Juss. and were relocated within genus *Myrciaria* O. Berg (Berg, 1857). As some floral traits diverged from other species of genus *Myrciaria*, species of jaboticabeira were transferred to genus *Plinia* (Kausel, 1956; Sobral, 1985; Mattos, 1998). Currently, 80 species of *Plinia* are accepted (Govaerts *et al.*, 2008).

Given the morphological variation observed in characteristics of fruits (Table 1, Table 2 and Table 3), the taxonomy of *Plinia* species is fairly a puzzle in the scientific literature. A miscellaneous of different species is suggested by diverging authors, making advances in selection, domestication, and breeding difficult.

Besides recognizing the morphological multiplicity, understanding the genetic divergence among species can be useful for the comprehension and conservation of the available genetic resources. Moreover, the morphological differences among some *Plinia* species are rather modest, making the species delimitation a great challenge for breeders and farmers.

Despite these needs, only a few studies using molecular markers were published, reporting the comparative analysis among different species of *Plinia*. Pereira *et al.* (2005) used 45 polymorphic RAPD markers in a study including *P. jaboticaba*, *P. cauliflora*, *P. coronata*, and *P. phitrantha*, while Vilela *et al.* (2012) used 37 polymorphic RAPD markers to study the relationship among *P. cauliflora*, *P. jaboticaba*, *P. coronata*, and *P. peruviana*.

In both studies, clustering analyses were unsuited for defining the taxonomic groups, since the formed clusters comprised assortments of plants from different species and did not correspond to the taxonomic classifications based on morphological traits. Moreover, RAPD markers are not confident for such an analysis, due to several technical weaknesses.

The advances of the sequencing platforms have enabled researchers to generate comprehensive genomic data for several plant species, including also minor-crop species. Sequences of the complete chloroplast genome (plastome) of *P. cauliflora*, *P. aureana*, and *P. trunciflora* are available in the GenBank database. To test the usefulness of these molecular data for understanding the taxonomic relationship among *Plinia* species, the plastome sequences of *P. cauliflora* (KX527622; Machado *et al.*, unpublished), *P. aureana* (KY392759; Machado *et al.*, unpublished), *P. trunciflora* (KU318111; Eguluz *et al.*, 2017), *Acca sellowiana* (KX289887; Machado *et al.*, 2017), *Campomanesia xanthocarpa* (KY392760; Machado *et al.*, 2020), and *Allosyncarpia ternata* (KC180806; Bayly *et al.*, 2013) were downloaded and a phylogenomic analysis was performed. This analysis (Figure 2) enabled more accurate analysis of the correlation among these *Plinia* species. Although the length, genetic composition, and structure of the plastomes are conserved among these species, the phylogenomic analysis based on the whole plastomes sequences resolved these three species with high support (Figure 2).

Thus, sequencing the plastomes of more *Plinia* species seems to be a meaningful strategy for resolving the remaining taxonomic uncertainties in this group, aiding the planning of conservation and breeding programs for *Plinia* species.

Germplasm conservation and genetic improvement also need molecular genetic studies

Information about the genetic diversity of natural populations is also needed when aiming at the establishment of germplasm banks and genetic improvement of the species (Melo *et al.*, 2015). Cruz *et al.* (2016) evaluated the genetic diversity of *Plinia* spp. in Northeastern

Table 1. Morphological characteristics of *Plinia cauliflora*, *P. jaboticaba* and *P. aureana* according to Lorenzi (2000), Lorenzi *et al.* (2006), and Lorenzi (2011).

Species	Characteristics			
	Tree	Leaves	Flowers	Fruits
<i>Plinia cauliflora</i>	- Height: 3-9 m - Dense cup - Tortuous trunk, with smooth, light brown, and spotted bark.	- Length: 3 - 7 cm - Glabrous - Lanceolate to oblong-lanceolate blade, with acuminate apex and acute or obtuse base.	- White color - Very short pedicels of about 1 mm, uniflorous, with ciliated bracts - Glabrous floral button - Chalice with cylindrical lobes - Petals largely oblong.	- Diameter: 2.2 - 2.8 cm - Globous, smooth and shiny berry - Dark purple color - Pulp is generally sweet.
<i>Plinia jaboticaba</i>	- Height: 4-9 m - Dense cup - Knotty and tortuous trunk, with smooth and thin bark of uniform brownish-brown color or with lighter spots.	- Length: 2.4 - 4.3 cm, - Lanceolate blade, with acute apex and obtuse base, - Glabrous (except for the central rib on the underside).	- White color, - inflorescence in a fascicle, with medium pedicels, and hairy bracts imbricated and irregularly arranged, - Chalice with 4 ovate, ciliated, and unequal lobes.	- Diameter: 2.2 - 2.8 cm, - Globous berry and thin skin, - Dark purple color, - Sweet pulp.
<i>Plinia aureana</i>	- Height: 2-4 m - Dense pyramidal cup, - Tortuous and fluted trunk, with reddish-brown and spotted bark.	- Length: 5.5 - 11.0 cm, - Oblong or lanceolate blade, with a gradually accentuated apex and rounded base, - Glabrous on the upper face and sparse hair on the lower.	- White color, - Pedicels of 1 - 3 mm, - Obovate floral button with sparse hair, - Hairy bracts of just over 1 mm, - Glabrous petals about 2 mm long.	- Diameter: 1.0 - 2.5 cm, - Subglobosa-oblique berry, side and glabrous, - Light green color, - Very sweet pulp.

Brazil. Thirty-five genotypes were characterized using ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) markers. With a polymorphism of 99.65%, five groups were identified based on the genetic divergence among genotypes. Moreover, no correlation between geographical and genetic distances among genotypes was observed. This study revealed the existence of moderate genetic variability of the studied genotypes, an important insight regarding plant collection for breeding programs in the region.

The organization and distribution of population genetic variability of six populations of *P. peruviana* based on microsatellite markers were reported by Salla (2019). Ten microsatellite loci revealed significant genetic diversity for the six populations, with a high number of alleles and heterozygosity. The analyses of the molecular diversity partition revealed 17.6% of differentiation among populations, 2.6% within populations, and 72.2% within individuals. These results suggest that for conservation proposes, seed

Table 2. Morphological characteristics of *Plinia coronata*, *P. grandifolia* and *P. oblongata* according to Lorenzi (2000), Lorenzi *et al.* (2006), and Lorenzi (2011).

Species	Characteristics			
	Tree	Leaves	Flowers	Fruits
<i>Plinia coronata</i>	- Height: 3-12 m, - Elongated cup, - Ribbed trunk, light brown and stained.	- Length: 4 - 6 cm, - Lanceolate blade, with acuminate apex and rounded base, - Glabrous, and pubescence only on the main vein (both sides).	- White color, - Clusters of 1 - 6, with pedicels of about 1 - 2 mm, surrounded by 4 rows of nested and ciliated bracts, - Oval-oblong and cylindrical petals.	- Diameter: 2.5 - 3.5 cm, - Globous berry. - Dark purple color, with whitish disc outline, apex. - Acidic pulp.
<i>Plinia grandifolia</i>	- Height: 4 - 8 m, - Dense cup, - Trunk somewhat tortuous and ribbed, with smooth brownish-brown bark with lighter spots.	- Length: 7 - 11 cm, - Oblong and oblong-lanceolate blade, with acuminate apex and obtuse base, - Glabra.	- White color, - Inflorescences with hairy pedicels, and equally hairy deciduous bracts, - Chalice with cylindrical sepals, - Petals largely obovate.	- Diameter: 1.5 - 2.5 cm, - Globous and smooth berry, - Dark purple color, - Acidic or sweet pulp.
<i>Plinia oblongata</i>	- Height: 4 - 6 m,	- Length: 2.0 - 4.5 cm, - Glabrous, and pubescence only on the main vein (both sides), - Ciliary margin.	- White color, - Pedicels very short and hairy with about 2mm and the base is surrounded by bracts.	- Diameter: 2.5 - 3.0 cm, - Slightly ovate-elliptical to elliptical, and smooth, - Dark purple color, - Very acidic pulp.

collections should maximize the number of seeds per matrix plant, lessening the number of individuals per population (Salla, 2019).

This scarcity of genetic studies and the small geographical amplitude of the two existing studies with *Plinia* spp. natural populations hinders planning reliable programs of *in situ* or *ex situ* species conservation, seed collection, genotype selection, and genetic improvement. So, efforts towards characterizing the genetic diversity and structure of *Plinia* spp. natural populations using molecular markers and in a wider geographical perspective is needed.

Moderate to low rooting rates is the main limitation for traditional vegetative propagation of *Plinia* species

A review on the propagation of *Plinia* spp. by Silva *et al.* (2018) highlighted that the main form of seedling production is still carried out mainly by seeds, due to the greater ease and speed in the production of new plants. However, despite good germination rates, seed recalcitrance (Danner *et al.*, 2011; Hössel *et al.*, 2013) hampers the establishment of orchards through sexual propagation and studies about the conditions of seed germination of *Plinia* species (Andrade and Martins, 2003; Wagner *et al.*, 2006; Alexandre

Table 3. Morphological characteristics of *Plinia peruviana*, *P. phitrantha* and *P. spiritosantensis* according to Lorenzi (2000), Lorenzi *et al.* (2006), and Lorenzi (2011).

Species	Characteristics			
	Tree	Leaves	Flowers	Fruits
<i>Plinia peruviana</i>	- Height: 4 - 14 m, - Dense and globose cup, - Straight and knotty trunk, with smooth brownish-brown bark with lighter spots.	- Length: 2 - 7 cm, - Lanceolate to the ovate-lanceolate blade, with long-acuminate apex and obtuse or corded base.	- White color, - Inflorescence (4 to 8 flowers) in racemes, with an almost zero primary axis and several pubescent pedicels of 10 - 15 mm, - Globose floral bud of about 0.5 cm in diameter.	- Diameter: 1.8 - 2.5 cm, - Globous berry, - Dark purple color, - Sweet pulp.
<i>Plinia phitrantha</i>	- Height: 4 - 7 m, - Ribbed trunk, with thin brownish-yellow bark with lighter spots,	- Length: 4.0 - 14.0 cm, - Oblong to oblong-lanceolate blade, with acute apex and underlay base, - Almost glabrous on the upper side and pubescent on the lower side.	- White color, - Scaly and rounded scaly bracts at the base of the pedicels, - Chalice with 4 glabrous sepals.	- Diameter: 1.5 - 2.5 cm, - Subglobous and side, - Red to purple color, - Sweet pulp.
<i>Plinia spiritosantensis</i>	- Height: 3 - 6 m, - Dense cup, with smooth, brownish skin with grayish spots.	- Length: 3.2 - 9.5 cm, - Ovate-oblong or lanceolate blade, with acute or slightly acuminate apex, and corded base, - Glabrous on the upper face (except on the central rib that is hairy), and sparse-hairy on the lower.	- White color, - Hairy pedicels of 1 - 1.2 mm, - Goblots with obovate and concave, ciliated sepals, about 2 mm long.	- Diameter: 2.0 - 3.0 cm, - Globous berry, - Purplish color.

et al., 2006; Rossa *et al.*, 2010; Sartor *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2011) are puzzling and inconclusive.

The development of methods for the asexual propagation of *Plinia* spp. is of great importance for obtaining seedlings. In addition to reducing the juvenile phase, vegetative propagation has

some advantages such as maintenance of the genetic characteristics of the mother plant, greater productivity, and fruits of better quality (Danner *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2011). However, there is no established fully efficient methods of vegetative propagation of *Plinia* spp. that ensure the formation of commercial orchards in a short period.

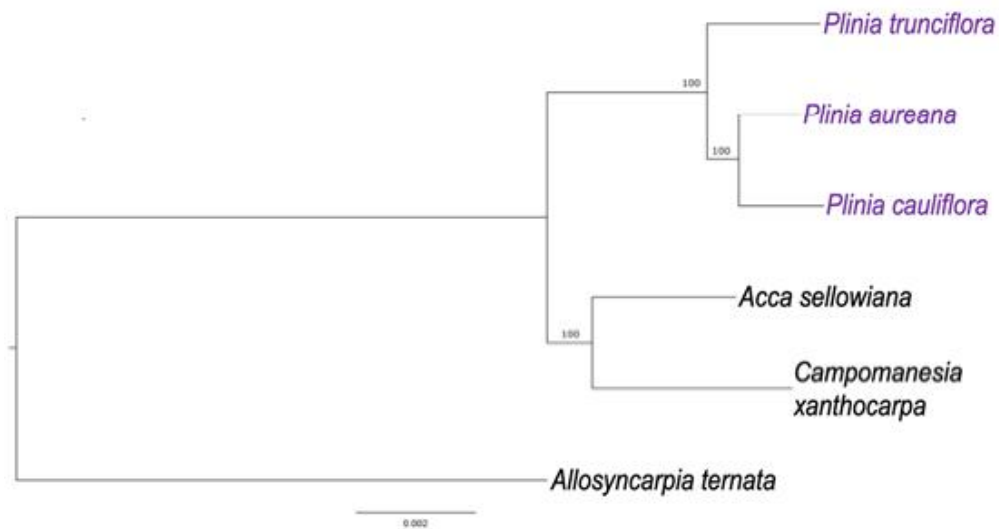


Figure 2. Phylogenomic analysis based on the whole plastome sequences of *Plinia cauliflora*, *P. aureana*, *P. trunciflora*, *Acca sellowiana*, *Campomanesia xanthocarpa*, and *Allosyncarpia ternata*. The phylogenomic tree was obtained using the maximum likelihood algorithm, the GTR+G evolution model, and 1000 bootstrap replications for branch support, as implemented in the software RAxML, CIPRES Science Gateway V. 3.1 platform. *Allosyncarpia ternata* (Myrtaceae, Eucalypteae) was employed as an outgroup. All other species belong to the family Myrtaceae, tribe Myrteae.

In general, *Plinia* species are recalcitrant for the formation of adventitious roots, and layering seems to be a relatively effective method for vegetative propagation of the species. This method, mediated by indolebutyric acid (IBA) treatment provides the gathering of numerous rooting co-factors (Danner *et al.*, 2006; Sasso *et al.*, 2010; Cassol *et al.*, 2015). However, for the establishment of a conclusive protocol, new studies must be carried out, considering the percentage of harvesting of the transplanted seedlings, the minimum period for the disconnection of the mother plant layering, the quality of the roots formed, the time between the planting of seedlings in the field, and the beginning of fruit production.

The few studies using cutting as a propagation method in *Plinia* species (Pereira *et al.*, 2005; Fachinello *et al.*, 2005; Sartor *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2019) revealed rooting rates lower than 50%. For commercial seedling production, the percentage of cuttings rooting obtained should be higher than 70% (Hartmann *et al.*, 2011). The values reported for *Plinia* spp. are quite variable and usually lower than this threshold. The low rooting of the vegetative propagules seems to be correlated with the

age of the tissue, the type and time of collection of the cuttings, the presence or absence of growth regulators, and cuttings cultivation conditions. Therefore, several adjustments are needed to increase the rooting percentage in *Plinia* species propagated through the cutting technique.

Grafting has supported somewhat more promissory results as a vegetative propagation strategy for *Plinia* species. Setting values reaching up to 90% were reported (Manica, 2000; Sasso *et al.*, 2010, Franco *et al.*, 2010; Malagi *et al.*, 2012; Cassol *et al.*, 2017), but these results revealed to be dependent on the cultivars used and the season. Despite the optimistic results obtained, long-term field monitoring of plants produced from grafting is necessary so that compatibility is verified. Besides, it is still necessary to verify the evolution of growth in the field, and the time elapsed from grafting to the beginning of the fruiting of the grafted seedling.

Protocols of *in vitro* propagation are promising strategies for *Plinia* spp.

In vitro micropropagation is the most practical application of tissue culture and the one with

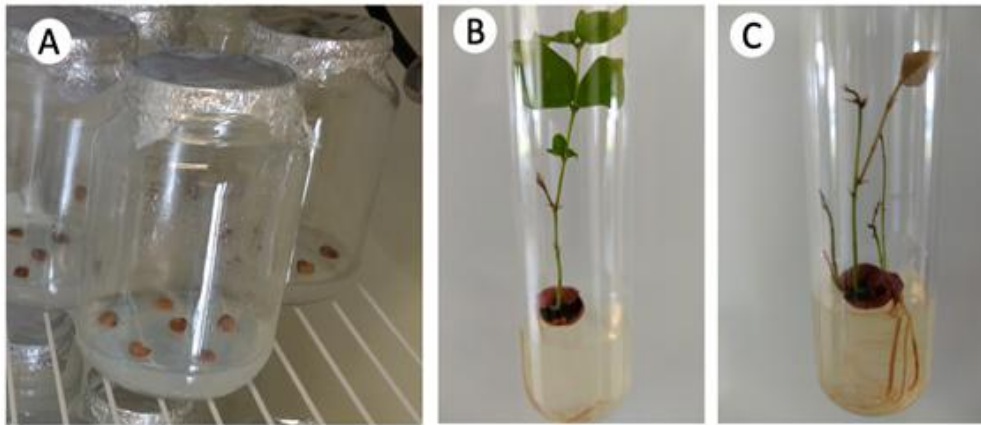


Figure 3. *In vitro* germination of *Plinia* spp. (A) *In vitro* axenic germination of seeds. (B) Germination of a single plantlet from the seed. (C) Polyembryony with four plantlets germinated from a single seed.

the greatest impact toward allowing conditions to obtain plants that are difficult to propagate and have long life cycles. This approach allows obtaining plants in an aseptic and controlled environment, faster than compared to conventional breeding. *In vitro* germination (Figure 3) can be the first step to obtain aseptic plants, which can be used as a source of propagules for micropropagation. *In vitro* germination of *Plinia* species also enables easy follow of the occurrence of polyembryony, since the number of embryos can reach up to five per seed (Figure 3C).

The *in vitro* germination of *P. jaboticaba* has been performed in MS (Murashige and Skoog, 1962) culture medium (Picolotto *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2019) and agar:water medium (5-6%, w/v). However, fungal and bacterial contaminations are the most worrisome issues. Treatments of the seeds with sodium hypochlorite (Picolotto *et al.*, 2007), and soaking for 24 hours in sterile water and antibiotics (Santos *et al.*, 2019) have been the commonly used methods for seeds disinfection. Besides, the germination is also influenced by the temperature of culture, but not by the photoperiod (Picolotto *et al.*, 2007), with the best germination rates at 25 °C.

Callogenesis was obtained in *P. cauliflora* leaf explants using MS medium with different combinations of plant growth regulators: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at 0.0, 1.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹ + 6-benzylaminopurine (BAP) at 0.0, 0.1, 0.2 mg l⁻¹ and naphthaleneacetic acid (NAA) at 0.0, 1.0, 2.0,

4.0 mg l⁻¹ + BAP (0.0, 1.0, 2.0 mg l⁻¹. All treatments presented callus formation, also in absence of plant growth regulators, not differing statistically (Cardoso, 2016).

Somatic embryos at the cotyledonary stage were obtained from seed explants of *P. peruviana* by Oliveira (2018). Pro-embryogenic masses were induced in 82.5% of explants using the two cotyledons detached and cultivated in the MS medium with 300 μM of 2,4-D and 1 g l⁻¹ of activated charcoal. During phase I of maturation, the most suitable medium for the conversion of somatic embryos at the torpedo stage was MS with 30 g l⁻¹ of polyethyleneglycol 4000 (77.5% of the formation of embryos in the torpedo stage). There was no conversion of somatic embryos into seedlings and the formation of embryos was possible up to the cotyledonary stage (3.05%), forming abnormal embryos. Anatomical studies showed the development of asynchronous somatic embryos.

Silveira *et al.* (2020) established a somatic embryogenesis protocol for *P. peruviana* using mature seeds (two separate cotyledons) as explant, inoculated in MS medium with the addition of 1000 mg l⁻¹ of glutamine, and 10 μM of 2,4-D. Larger embryos and in more advanced stages of development were obtained in a medium containing 60 g l⁻¹ of polyethyleneglycol 6000. There was no conversion of somatic embryos into seedlings and anatomical sections of the embryos revealed deleterious effects of the prolonged period of exposure to 2,4-D.

Although failing to convert somatic embryos into seedlings, the studies of Oliveira (2018) and Silveira *et al.* (2020) were pioneers in the development of a somatic embryogenesis protocol for *Plinia* spp.. Thus, further studies are needed to determine the optimum exposure period to 2,4-D for the formation of somatic embryos with normal morphology, which drives conversion to seedlings.

How may biotechnology help to boost jaboticaba into the market?

The fruits of *Plinia* species have a high market value, good organoleptic characteristics, high nutritive content, and beneficial properties to health. Thus, there is a forecast of growth in demand for fresh consumption and use by industries. As the cultivation of *Plinia* spp. is practically restricted to domestic orchards and the establishment of commercial plantations demands a large amount of vigorous and uniform selected seedlings, it is necessary to develop protocols of vegetative propagation. Micropropagation seems to be the most promising technique providing seedlings on a large scale with high phytosanitary quality, regardless of the time of year.

Plastome based phylogenomic studies may be an important strategy towards understanding the taxonomic relationships among *Plinia* species, as well as to verify the validity of all proposed species. Also, genetic studies using molecular markers should be performed to characterize the genetic diversity of natural populations towards germplasm conservation and genetic improvement of the species. This biotechnological tool can also be used to evaluate the somaclonal variation of micropropagated seedlings since in clonal propagation the main purpose is the maintenance of the genetic characteristics of selected plants. Besides, to circumvent situations in which the multiplication from natural seeds is problematic, the encapsulation of vegetative structures into sodium alginate droplets and protocols for cryopreservation of embryos and cell cultures are also needed for the species.

CONCLUSIONS

Aiming at seeking the market valuation of the fruits of *Plinia* spp., studies involving molecular

approaches are necessary to resolve the taxonomic uncertainties between species. In addition, the establishment of micropropagation protocols for jaboticabeira is needed to overcome the difficulties related to the vegetative propagation of these species.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) for the financial support and grant awarded to V.M.S. (Process 302501/2017-7) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) for the scholarship to D.D.S. (Finance code 001). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Authors contribution

Conceptualization, Investigation, and Writing - original draft DDS, LOO, DCB; Resources DDS; Writing-review and editing VMS; Methodology and Formal analysis DDS, LOM; Supervision VMS.

REFERENCES

- Alexandre RS, Wagner A, Negreiros JRS, Bruckner CH (2006) Estádio de maturação dos frutos e substratos na germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de jaboticabeira. R Bras Agrociência 12(2): 227-230
- Andrade RA, Martins ABG (2003) Influência da temperatura na germinação de sementes de jaboticabeira. Rev Bras Frutic 25: 197-198; doi: 10.1590/S0100-29452003000100056
- Bayly MJ, Rigault P, Spokevicius A, Ladiges PY, Ades PK, Anderson C, Bossinger G, Merchant A, Udovicic F, Woodrow IE, Tibbits J (2013) Chloroplast genome analysis of Australian eucalypts—*Eucalyptus*, *Corymbia*, *Angophora*, *Allosyncarpia* and *Stockwellia* (Myrtaceae). Mol Phylogenet Evol 69(3): 704-716; doi: 10.1016/j.ympev.2013.07.006

- Berg OC (1857) Myrtaceae. In: Martius CPF, Eichler A, Urban I (Eds). Flora Brasiliensis 14, pp. 1-528. R Oldenbourg Verlag, Múnich
- Cardoso BP (2016) Reguladores de crescimento na emergência e indução de calos de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel. MSc Thesis, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil
- Cassol DA, Wagner JA, Pirola K, Dotto M, Citadin I (2015) Embalagem, época e ácido indolbutírico na propagação de jabuticabeira por alporquia. Rev Bras Frutic 37(1): 267-272; doi: 10.1590/0100-2945-011/14
- Cassol DA, Pirola K, Dotto M, Citadin I, Mazaró SM, Wagner JA (2017) Grafting technique and rootstock species for the propagation of *Plinia cauliflora*. Ciência Rural 47(2): e20140452; doi: 10.1590/0103-8478cr20140452
- Cruz ES, Dantas ACVL, Carmo CD, Bastos LP (2016) Molecular characterization of jaboticaba tree genotypes located in the municipalities of Recôncavo of Bahia. Rev Bras Frutic 38(3): e-510; doi: 10.1590/0100-29452016510
- Danner MA, Citadin I, Fernandes AA, Assmann AP, Mazaró SM, Donazzolo J, Sasso SAZ (2006) Enraizamento de jabuticabeira (*Plinia trunciflora*) por mergulhia aérea. Rev Bras Frutic 28(3): 530-532; doi: 10.1590/S0100-29452006000300043
- Danner MA, Citadin I, Sasso SAZ, Ambrosio R, Wagner JA (2011) Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jabuticabeira. Rev Bras Frutic 33(1): 246-252; doi: 10.1590/S0100-29452011005000037
- Dias MA, Lopes JC, Souza Neto JD, Heberle H (2011) Influência da temperatura e substrato na germinação de sementes de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). Idesia 29(1): 23-27; doi: 10.4067/S0718-34292011000100004
- Eguiluz M, Yuyama PM, Guzman F, Rodrigues NF, Margis R (2017) Complete sequence and comparative analysis of the chloroplast genome of *Plinia trunciflora*. Genetics and Molecular Biology 40(4): 871-876; doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2017-0096
- Fachinello JC, Hoffmann A, Nachtigal JC (2005) Propagação de plantas frutíferas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília; ISBN: 8573833009
- Franco LRL, Silva JF, Maia VM, Lopes PS, Amorim IJF, Mizobutsi EH (2010) Pegamento e crescimento inicial de mudas de jabuticabeiras 'açú' e 'sabará' submetidas a dois tipos de enxertia. Rev Ceres 57(4): 535-538; doi: 10.1590/S0034-737X2010000400016
- Govaerts R, Sobral N, Ashton P, Barrie F, Holst BK, Landrum LL, Matsumoto K, Fernanda Mazine F, Nic Lughadha E, Proença C (2008) World Checklist of Myrtaceae. Royal Botanic Gardens, Kew; ISBN: 1842463918
- Hartmann HT, Kester DE, Davies Júnior FT, Geneve RL (2011) Propagation: principles and practices. Prentice Hall, New Jersey; ISBN: 0135014492
- Hössel C, Oliveira JSMA, Fabiane KC, Wagner JA, Citadin I (2013) Conservação e teste de tetrazólio em sementes de jabuticabeira. Rev Bras Frutic 35(1): 255-261; doi: 10.1590/S0100-29452013000100029
- Kausel VE (1956) Beitrag zur Systematik der Myrtaceen. In: Kausel VE (Ed). Arkiv for Botanik, pp. 491-516. Almqvist and Wiksells Boktryckeri Ab, Estocolmo
- Lorenzi H (2000) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Instituto Plantarum, Nova Odessa; ISBN: 8586714119
- Lorenzi H (2011) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Instituto Plantarum, Nova Odessa; ISBN: 85-86714337
- Lorenzi H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S (2006) Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura. Instituto Plantarum, Nova Odessa; ISBN: 9788586714238
- Machado LO, Vieira LN, Stefenon VM, Pedrosa FO, Souza EM, Guerra MP, Nodari RO (2017) Phylogenomic relationship of feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) with other Myrtaceae based on complete chloroplast genome sequences. Genetica 145(2): 163-174; doi: 10.1007/s10709-017-9954-1

- Machado LO, Vieira LN, Stefenon VM, Faoro H, Pedrosa FO, Guerra MP, Nodari RO (2020) Molecular relationships of *Campomanesia xanthocarpa* within Myrtaceae based on the complete plastome sequence and on the plastid *ycf2* gene. *Genetics and Molecular Biology* 43(2): e20180377; doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2018-0377
- Malagi G, Citadin I, Scariotto S, Wagner JA, Sacht MR (2012) Enxertia interespecífica de jaboticabeira: influência do tipo de garfo. *Ciênc Rural* 42(2): 221-224; doi: 10.1590/S0103-84782012005000006
- Manica I (2000) Frutas nativas, silvestres e exóticas 1: técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biriba, carambola, cereja-do-rio-grande, jaboticaba. Cinco Continentes, Porto Alegre; ISBN: 8586466123
- Mattos JR (1998) Novidades Taxonômicas em Myrtaceae. *Loefgrenia: Comunicações Avulsas de Botânica* 112: 5
- Melo ATO, Coelho ASG, Pereira MF, Blanco AJV, Franceschinelli EV (2015) Genética da conservação de *Cabralea canjerana* (vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de mata atlântica na APA Fernão Dias. *Rev Árvore* 39(2): 365-374; doi: 10.1590/0100-67622015000200016
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Oliveira FLR (2018) Embriogênese somática em jaboticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel). MSc Thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil
- Oliveira GP, Angelotti-Mendonça J, Tanaka FAO, Silva SR, Scarpate Filho JA (2019) Origin and development of reproductive buds in jaboticaba cv. Sabará (*Plinia jaboticaba* Vell). *Scientia Horticulturae* 249: 432-438; doi: 10.1016/j.scienta.2019.02.020
- Pereira M, Oliveira AL, Pereira REA, Sena JAD, Costa JRV, Almeida M, Gonçalves AN (2005) Morphologic and molecular characterization of *Myrciaria* spp. species. *Rev Bras Frutic* 27(3): 507-510; doi: 10.1590/S0100-29452005000300040
- Picolotto L, Schuch MW, Souza JA, Silva LC, Ferri J, Fachinello JC (2007) Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jaboticabeira. *Sci Agrar* 8(1): 19-23; doi: 10.5380/rsa.v8i1.8337
- Pitz HS, Pereira A, Voytena APL, Trevisan ACD, Affonso RCL, Ribeiro-do-Valle RM, Maraschin M (2017) Cytoprotective Effects of Jaboticaba (*Plinia peruviana*, Poir. Govaerts) Fruit Peel Extracts against H2O2-Induced Oxidative Stress. *Reactive Oxygen Species* 4(11): 362-371; doi: 10.20455/ros.2017.859
- Rossa ÜB, Triches GP, Grossi, Nogueira AC, Reissmann CB, Ramos MR (2010) Germinação de sementes e qualidade de mudas de *Plinia trunciflora* (jaboticabeira) em função de diferentes tratamentos pré germinativos. *Floresta* 40(2): 371-378; doi: 10.5380/rf.v40i2.17832
- Rufino MSM, Alves RE, Fernandes FAN, Brito ES (2011) Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. *Food Res Int* 44(7): 2072-2075; doi: 10.1016/j.foodres.2010.07.002
- Salla VP (2019) Diversidade e estrutura genética populacional em jaboticabais nativos no sudoeste do Paraná. PhD thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Brazil
- Santos SK, Luna NP, Costa JO, Dias M, Gomes D, Fonseca K (2019) Germination *in vitro* of Jaboticabeira *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg. *J Exp Agric Int* 35(6): 1-8; doi: 10.9734/jeai/2019/v35i630221
- Sartor FR, Müller NTG, Moraes AM (2010) Efeito do ácido indolbutírico e de substratos na propagação de estacas e sementes de jaboticabeira. *Tecnol and Ciên Agropec* 4(3): 11-15
- Sasso SAZ, Citadin I, Danner MA (2010) Propagação de jaboticabeira por enxertia e alporquia. *Rev Bras Frutic* 32(2): 571-576; doi: 10.1590/S0100-29452010005000055
- Silva CP, Lacerda EG, Sanches LFJ, Queiroz JO, Marchiotti RCB (2019) Enraizamento de estacas de Jaboticabeira tratadas com ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno acético

- (ANA). Rev Agr Acad 2(3): 122-132; doi: 10.32406/v2n32019/122-132/agrariacad
- Silva JAA, Teixeira GHA, Martins ABG, Citadin I, Wagner JA, Danner MA (2018) Advances in the propagation of Jaboticaba tree. Rev Bras Frutic 41(3): e-024; doi: 10.1590/0100-29452019024
- Silveira SS, Santos BFS, Degenhardt-Goldbach J, Quoirin M (2020) Somatic embryogenesis from mature split seeds of jaboticaba (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts). Acta sci 42(1): e43798; doi: 10.4025/actasciagron.v42i1.43798
- Sobral M (1985) Alterações nomenclaturais em *Plinia* (Myrtaceae). Boletim do Museu Botânico de Curitiba 63: 1-4
- Teixeira LN, Stringheta PC, Oliveira FA (2008) Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. Ceres 55(4): 297-304
- Vilela RCF, Assis JGA, Filho LN, Viana BF (2012) Sistema reprodutivo e diversidade genética de quatro espécies de *Myrciaria* (Myrtaceae, jaboticabeiras). Acta Bot Bras 26(4): 727-734; doi: 10.1590/S0102-33062012000400002
- Wagner JA, Silva JOC, Pimentel LD, Negreiros JRS, Alexandre RS, Morgado MAD, Álvares VS, Bruckner CH (2006) Germinação e emergência de três espécies de jaboticabeira em quatro substratos. Revista Ceres 53(307): 322-327
- Wagner JA, Silva JOC, Pimentel LD, Santos CEM, Bruckner CH (2011) Germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de jaboticabeira em função do tamanho de sementes. Acta Sci 33(1): 105-109; doi: 10.4025/actasciagron.v33i1.4881

Recibido: 28-12-2020

Aceptado: 02-02-2021

This is an open access article distributed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> The use, distribution or reproduction is permitted citing the original source and authors.

5 CAPÍTULO II

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CALOGÊNESE *IN VITRO* DE *Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS (MYRTACEAE)

RESUMO

A jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts) é uma espécie de difícil cultivo e com longo período juvenil quando propagada por sementes. Para que a espécie seja explorada comercialmente estudos básicos de propagação são necessários. Assim, o presente estudo tem por objetivo estabelecer um método de germinação das sementes e um protocolo de calogênese *in vitro* com caracterização anatômica dos calos. Para germinação *in vitro* foram testadas métodos de desinfestação das sementes, com etanol 70%, hipoclorito de sódio a 1,25% ou 2,5% por 10 ou 20 minutos, e enxágue em água ultrapura e autoclavada. Para calogênese foram testadas duas fontes de explante, e cinco combinações de ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina), além do tratamento controle. Houve sucesso no estabelecimento de plântulas e os métodos de desinfestação das sementes não influenciaram significativamente nas variáveis analisadas, indicando-se o Álcool 70% e a Água ultrapura autoclavada que foi o tratamento mais brando e com melhor IVG. A calogênese e rizogênese em segmentos nodais ocorreu na ausência ou presença de ANA e BAP, e em discos foliares somente com a adição de reguladores de crescimento no meio de cultivo, em doses iguais ou superiores a 5,40 μM de ANA + 0,44 μM de BAP. O desenvolvimento de raízes nos calos evidencia a ocorrência de organogênese indireta, no entanto, a rizogênese não foi totalmente dependente da calogênese. A partir de análises anatômicas observa-se que os calos têm características não embriogênicas com células parenquimáticas grandes, desorganizadas e vacuolizadas. Para o estabelecimento *in vitro* de plântulas não é necessário o uso de NaOCl na desinfestação das sementes, e obteve-se calogênese a partir de segmentos nodais e discos foliares de plântulas previamente germinadas *in vitro*.

Palavras-chave: Jabuticabeira. Propagação *in vitro*. Caracterização anatômica.

1 INTRODUÇÃO

Espécies de Myrtaceae destacam-se entre as fruteiras nativas do Brasil, sendo considerada uma importante família da flora brasileira a ser explorada comercialmente. Entretanto, são necessários estudos básicos relacionados a propagação dessas espécies. A jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts) apresenta frutos com grande potencial, por possuírem elevado valor nutritivo, altos teores de vitaminas do complexo B, principalmente B2 e niacina, e vitamina C, além de sais minerais como ferro, cálcio e fósforo (INADA et al., 2015). Além disso, a jabuticabeira é uma rica fonte de antocianinas, classe de flavonoides particularmente evidente em frutas de cor escura e com importantes propriedades antioxidantes (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Apesar do elevado potencial e aceitabilidade apresentado pelos frutos, um dos obstáculos encontrados para a instalação de povoamentos de jabuticabeira é a sua propagação, sendo considerada de difícil cultivo e com período juvenil muito longo, oito a quatorze anos, quando propagada sexualmente. Além disso, as sementes apresentam características de recalcitrância perdendo rapidamente a viabilidade quando armazenadas (SANTOS et al., 2021). Uma alternativa para propagação de espécies de difícil cultivo é a utilização de técnicas de cultura de tecidos, as quais apresentam diversas vantagens, tais como a possibilidade de conservação de germoplasma *in vitro*, propagação de clones superiores, estabelecimento de culturas livres de patógenos, patenteamento de processos e materiais obtidos pela biotecnologia, além de servirem de base para outras técnicas biotecnológicas, a exemplo da transformação genética (LIMA et al., 2021).

A micropropagação visa promover a obtenção de plantas *in vitro* por meio de duas rotas morfogênicas: a organogênese e a embriogênese somática, podendo ocorrer de maneira direta ou indireta, sendo que esta segunda passa, obrigatoriamente pela fase de calo (GUPTA et al., 2020). A calogênese é uma das vias de regeneração *in vitro* de plantas, que tem como princípio formar células não especializadas (desdiferenciadas), com capacidade de se diferenciar, originando raízes, brotos e embriões somáticos (GOLLE et al., 2020a). A formação de calos ocorre em resposta dos explantes a condições químicas (fatores nutricionais) e físicas (temperatura, luminosidade, pH), além do tipo de explante. Os calos são

propícios à proliferação e à morfogênese *in vitro*, já que são tecidos jovens e desdiferenciados, o que lhes atribui possibilidades de uso (GOLLE et al., 2020b).

Para a micropropagação, plântulas obtidas da germinação *in vitro* podem ser fracionadas e subcultivadas. A utilização de explantes provenientes de plantas previamente estabelecidas *in vitro* torna a micropropagação uma técnica viável sob o ponto de vista experimental e fisiológico, se comparado a explantes retirados de plantas adultas (PARANHOS et al., 2017). A vantagem desse tipo de material é a disponibilidade de explantes assépticos com capacidade de crescimento em resposta à aplicação de reguladores de crescimento (STEFENON et al., 2020). O estabelecimento de protocolos de desinfestação das sementes se torna necessário para obtenção de plântulas assépticas, visto que a contaminação microbiana é responsável por perdas consideráveis de material vegetal e se configura como um importante ponto de controle na propagação *in vitro* (ESPOSITO-POLESI, 2020).

Adicionalmente, estudos histológicos tornam-se importantes para caracterizar o processo e as vias de regeneração de plantas *in vitro* (BARRACO et al., 2014). Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo estabelecer um método de germinação das sementes e um protocolo de calogênese *in vitro* para *Plinia peruviana*, utilizando segmentos nodais e discos foliares como explantes de plântulas previamente germinadas *in vitro*. Além da caracterização dos calos a partir de análises morfoanatômicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Germinação *in vitro* de sementes e estabelecimento de plântulas

Para obtenção das sementes, frutos maduros foram coletados diretamente de uma planta adulta de jabuticabeira, sendo a coloração do epicarpo roxo escuro e o bom estado fitossanitário os critérios de seleção. A polpa dos frutos foi eliminada manualmente a partir da lavagem em água corrente, sendo possível obter de uma a três sementes de diferentes tamanhos. A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, com etanol 70% agitando por dois minutos, solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) na concentração de 1,25% ou 2,5% com

agitação por 10 ou 20 minutos, e enxágue triplo em água ultrapura e autoclavada (Tabela 1). O meio de cultivo utilizado foi composto por ágar Bio Basic (6,5 g L⁻¹) e água ultrapura, sendo autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 18 minutos.

Tabela 1. Tratamentos utilizados na desinfestação das sementes de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts para realização da germinação *in vitro*.

Tratamentos	Desinfestação das sementes
T1	Álcool 70%/ Água ultrapura autoclavada
T2	Álcool 70%/ NaOCl 1,25% 10 min./ Ág. aut.
T3	Álcool 70%/ NaOCl 1,25% 20 min./ Ág. aut.
T4	Álcool 70%/ NaOCl 2,5% 10 min./ Ág. aut.
T5	Álcool 70%/ NaOCl 2,5% 20 min./ Ág. aut.

Após a desinfestação as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (150 mm x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura (ágar + água ultrapura autoclavada), sendo os mesmos fechados com papel alumínio e filme de PVC. Após transferidos para condições controladas em estufa incubadora BOD a temperatura de 25 ±1°C e fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de aproximadamente 40 μmol m⁻² s⁻¹ a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

A avaliação da germinação teve início um dia após inoculação (d.a.i), com intervalos de 3 a 60 dias. A referência utilizada para considerar as sementes germinadas foi a emissão da radícula. Após 60 dias de inoculação determinou-se a porcentagem de germinação, formação de plântulas normais (desenvolveram a planta completa com caule e folhas), contaminação e poliembrionia (sementes que desenvolveram mais de uma plântula); altura da parte aérea da maior plântula (cm) e comprimento da maior raiz (cm); número de plântulas por semente, folhas, nós caulinares e raízes; e o índice de velocidade de germinação (IVG) a partir da fórmula:

$$IVG = G1/T1 + G2/T2 + \dots Gn/Tn$$

Onde G= número de sementes germinadas em determinada contagem e T= número de dias da semeadura à 1^a, 2^a, ... 60^a avaliação.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento de germinação *in vitro* foi instalado em delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento com 5 repetições, sendo cada repetição composta por 10 sementes, totalizando 250 sementes no experimento. Utilizou-se uma semente por tubo de ensaio. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se programa estatístico Genes (CRUZ, 2013).

2.2 Indução da calogênese *in vitro*

Para o experimento de calogênese foram utilizados segmentos nodais e discos foliares de plântulas previamente estabelecidas *in vitro* com 60 dias de cultivo. O meio de cultivo utilizado foi o MS1/2 (metade da concentração de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas) (MURASCHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar Bio Basic, 0,25 g L⁻¹ dos antioxidantes ácido cítrico (esterilizado à frio e adicionado ao meio de cultivo após a autoclavagem) e polivinilpirrolidona (PVP). O pH foi ajustado para 5,8 ±0,1 antes do meio ser semi-solidificado, e após autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 18 minutos.

Foram utilizados como explantes segmentos nodais (1,0 cm) de diferentes posições do ramo (inoculados horizontalmente no meio de cultivo) e discos foliares (1,0 cm²) (inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura). Foram testadas cinco combinações de ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina), além do tratamento controle caracterizado pela ausência de reguladores de crescimento (Tabela 2). Em condições assépticas os explantes foram excisados e colocados em placas de Petri (90 X 15 mm) contendo 25 mL de meio de cultura, sendo fechados com filme de PVC e então transferidos para condições controladas de ambiente em BOD com temperatura de 25 ±1°C e mantidos no escuro.

Tabela 2. Tratamentos utilizados para indução da calogênese em segmentos nodais e discos foliares de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts.

Tratamentos	Concentrações hormonais
T1	Controle (sem reguladores de crescimento)
T2	2,70 μM de ANA + 0,22 μM de BAP
T3	5,40 μM de ANA+ 0,44 μM de BAP
T4	8,1 μM de ANA+ 0,66 μM de BAP
T5	10,80 μM de ANA + 0,88 μM de BAP
T6	13,5 μM de ANA + 1,1 μM de BAP

As culturas foram subcultivadas a cada 30 dias (meios idênticos de indução da calogênese), e 60 d.a.i. foram avaliados a porcentagem de formação de calos a partir de segmentos nodais e discos foliares, além do tipo (friável ou compacto) e coloração dos calos. Adicionalmente, aos 100 d.a.i. avaliou-se o percentual de calos rizogênicos obtidos.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi instalado em delineamento em esquema fatorial (2x6), onde os tratamentos analisados foram os tipos de explantes (dois – segmentos nodais e discos foliares) e as concentrações dos reguladores de crescimento (seis), constituindo 12 tratamentos. Cada tratamento com quatro repetições compostas por cinco explantes cada, totalizando 240 explantes no experimento. Utilizou-se para cada repetição uma placa de Petri. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se programa estatístico Genes (CRUZ, 2013).

2.3 Análises anatômicas

As amostras de calos obtidos aos 100 dias a partir de segmentos nodais e discos foliares foram fixadas em formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2),

à temperatura ambiente sob vácuo por 24 h. Posteriormente foi realizada a lavagem no mesmo tampão por duas vezes, e após a desidratação em série etílica (40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) permanecendo por uma hora em cada concentração. Após as amostras foram pré-infiltradas em historresina: etanol 100% (1:1) durante 48 horas e, em seguida realizou-se a infiltração com resina de hidroxietil metacrilato (Leica Historesina), seguindo as recomendações do fabricante.

Análises anatômicas foram realizadas apenas nos tratamentos que promoveram resultados visuais mais promissores para a calogênese (Para segmentos nodais utilizou-se os calos obtidos através do Tratamento 2. Para discos foliares os obtidos do Tratamento 4). Cortes de 6 µm de espessura foram obtidos com uso de micrótomo rotativo (RM 2255, Leica), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40°C, e corados com azul de toluidina a 0,05% em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) (O'BRIEN et al., 1965). A análise e documentação fotográfica foram realizadas em microscópio óptico Zeiss equipado com software Guide ZEN 2 (blue edition).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação *in vitro* de sementes e estabelecimento de plântulas

Os métodos de desinfestação não influenciaram significativamente nos percentuais de germinação *in vitro* das sementes de *P. peruviana* (Tabela 3). A germinação foi alta e variou de 96% a 100%, demonstrando que o meio de cultivo ágar + água foi o suficiente para promover a germinação (Figura 1 – A, B, C e D). Resultado semelhante foi relatado por Wagner Júnior et al. (2011) ao testarem diferentes tamanhos de sementes de jabuticabeira, obtendo percentuais de germinação em casa de vegetação de até 100% para *P. peruviana* e 99,1% para *P. jabuticaba* (Vell.) Berg. Santos et al. (2019) ao estudarem a germinação *in vitro* de jabuticabeiras obtiveram percentuais de germinação de 68 a 74% e Picolotto et al. (2007) de 0% a 8%, resultados inferiores aos encontrados para *P. peruviana*.

Tabela 3. Percentuais de germinação, plântulas normais e contaminação, e índice de velocidade de germinação (IVG) obtidos a partir da germinação *in vitro* de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, após as sementes serem submetidas a métodos de desinfestação aos 60 dias após inoculação.

DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES	Germinação (%)	Plântulas normais (%)	Contaminação (%)	IVG
T1	98	34	2	3,46
T2	96	28	2	2,42
T3	98	34	4	2,6
T4	100	40	0	2,7
T5	98	30	4	2,4
Média	98 ns	33,2 ns	1,5 ns	2,71

* ns: Não significativo. **T1:** Álcool 70%/ Água ultrapura autoclavada; **T2:** Álcool 70%/ NaOCl 1,25% 10 min./ Água ultrapura autoclavada; **T3:** Álcool 70%/ NaOCl 1,25% 20 min./ Água ultrapura autoclavada; **T4:** Álcool 70%/ NaOCl 2,5% 10 min./ Água ultrapura autoclavada; **T5:** Álcool 70%/ NaOCl 2,5% 20 min./ Água ultrapura autoclavada.

Hartmann et al. (2011) relata que as mudas de jabuticabeira não se desenvolvem de forma sincrônica, podendo não formar plantas completas. O percentual de desenvolvimento de plântulas normais foi baixo em relação aos altos percentuais de germinação obtidos, não diferindo significativamente e variando de 28 a 40% (Tabela 3). Dias et al. (2011) ao testar o uso de diferentes substratos e temperaturas na germinação de *P. cauliflora* (Mart.) Kausel, obteve a formação de plântulas normais variando de 0 a 50%, com maior porcentagem a temperatura de 20 – 30°C e substrato terra + areia + esterco.

A contaminação microbiana se configura como um importante ponto de controle e cuidado dentro da cultura de tecidos, sendo responsável por perdas consideráveis de material vegetal (ESPOSITO-POLESI, 2020). Os percentuais de contaminação fúngica e endofítica foram baixos, variando de 0 a 4% e ocorrendo até os 15 d.a.i (Tabela 3), determinando o sucesso do estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas de jabuticabeira. Possivelmente, os baixos percentuais de contaminação podem ser decorrentes da não adição de carboidratos e MS em meio de cultura, que podem potencializar o desenvolvimento de microrganismos.

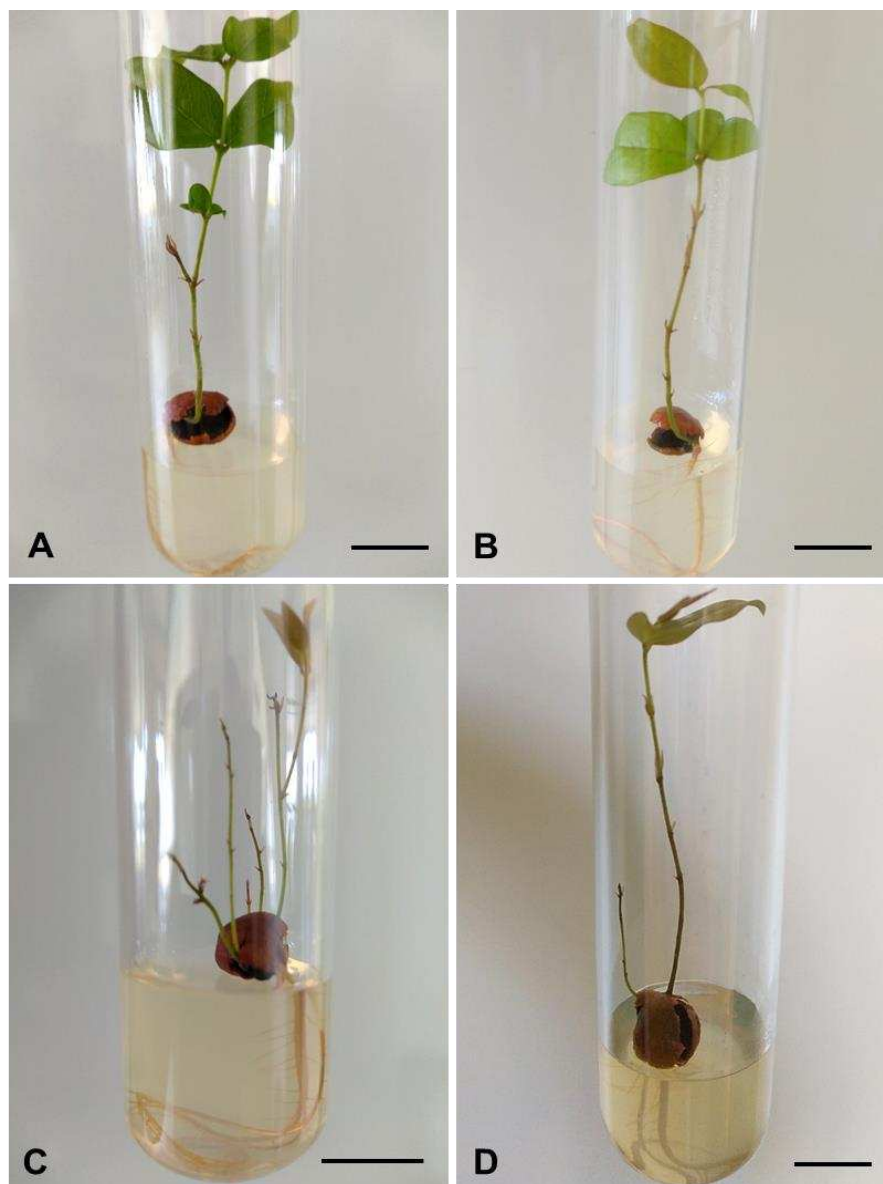


Figura 1. Germinação *in vitro* de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts em meio de cultura contendo ágar e água ultrapura aos 60 dias após inoculação. As sementes foram desinfestadas com álcool 70% + água ultrapura autoclavada (**A**, **C** e **D**) e álcool 70% + hipoclorito de sódio a 1,25% por 10 minutos + água ultrapura autoclavada (**B**). **A** e **B**: Obtenção de uma plântula de jabuticabeira a partir de uma semente. **C** e **D**: Poliembrião evidente através da obtenção de mais de uma plântula de jabuticabeira a partir de uma semente. Barras = **A**, **B**, **C** e **D**: 1,0 cm.

Picolotto et al. (2007) avaliaram a desinfestação das sementes de jabuticabeira utilizando hipoclorito de sódio a 2,5 e 5%, e obteve contaminação de 10 e 2%, respectivamente. Em contrapartida, os percentuais de germinação obtidos foram muito baixos (0 a 8%). De acordo com Palú et al. (2011), o uso de soluções desinfestantes pode causar fitotoxicidade e ser um fator limitante para o desenvolvimento dos explantes. A ação fitotóxica geralmente ocorre devido a

distúrbios da síntese de proteínas e ação inibitória na síntese de RNAs e ATPs, com interferência nos sistemas de energia da planta. No presente estudo, a concentração de NaOCl utilizada foi igual ou menor que Picolotto, a contaminação foi semelhante e a germinação superior, pressupondo que possivelmente não houve ação fitotóxica.

O índice de velocidade de germinação (IVG) relaciona o número de sementes germinadas por unidade de tempo. Quanto maior o IVG, maior será a velocidade de germinação, o que permite inferir que mais vigoroso é o lote de sementes (NAKAGAWA, 1999). O uso de álcool 70% + água ultrapura autoclavada (T1) mostrou o maior IVG (3,46), sendo que nos demais tratamentos esses índices foram menores e semelhantes (2,4 a 2,7), podendo o NaOCl ter interferido na velocidade de germinação das sementes (Tabela 3). Danner et al. (2006) ao estudar a germinação de *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel em casa de vegetação, obteve IVG variando de 0,77 a 1,31 conforme o tipo de substrato utilizado. Rossa et al. (2010) reportaram um IVG de 0,33 a 1,12 em sementes recebendo diferentes tratamentos pré-germinativos.

Segundo Donadio (2000) a germinação de sementes de jabuticabeira ocorre entre 10 e 40 dias após a semeadura. No presente estudo o tempo necessário para as sementes de *P. peruviana* germinarem foi de aproximadamente um mês e meio, iniciando a germinação 7 d.a.i. (T1), 10 d.a.i. (T2 e T3) e 13 d.a.i. (T4 e T5), e estendendo-se até os quarenta e seis dias. Para Wagner Júnior et al. (2006) a germinação de *P. peruviana* aconteceu 22 dias após semeadura, e para *P. cauliflora* (Mart.) Kausel e *P. jabuticaba* (Vell.) Berg aos 17 dias. O aparecimento dos cotilédones foi utilizado como referência para marcar o início do processo germinativo por Wagner Júnior, podendo o maior período para germinação das sementes ser decorrente disso.

O hipoclorito de sódio pode ter apresentado efeito fitotóxico nas sementes de jabuticabeira, pois na sua ausência a germinação foi precoce e com o aumento na concentração houve um atraso diretamente proporcional. Segundo Barral e Paz et al. (2018) e Paradelo (2011), a fitotoxicidade é a capacidade de substâncias específicas em causar danos, sejam eles duradouros ou temporários em plantas, através do atraso ou inibição na emergência, ou ainda afetar o crescimento da

planta, perda da planta inteira ou partes, necrose, modificação na cor e deformações.

Neste experimento, ficou evidente a presença de sementes poliembriônicas (Figura 1 – C e D) em *P. peruviana*, com poliembrionia observada em 125 sementes das 250 inoculadas (50%). Resultados inferiores foram encontrados por Santos et al. (2019) e Danner et al. (2011) para *Plinia jabuticaba* (Vell.) Berg e *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel, com percentuais de poliembrionia em média de 16% e 29,2%, respectivamente. As sementes que apresentam mais de um embrião são denominadas de poliembriônicas, e em *Plinia* spp. ocorre poliembrionia podendo chegar até 5 embriões (DANNER et al., 2011).

Neste estudo, observaram-se de uma a cinco plântulas por semente, com número médio de 1,69. As sementes que desenvolveram mais de uma plântula tiveram seu estabelecimento prejudicado, uma vez que, em sua maioria não formaram plantas completas (Figura 1 – C e D). A obtenção de mais de uma plântula por semente confirma a ocorrência de poliembrionia nas jabuticabeiras. Segundo Salla (2016) a ocorrência da poliembrionia nas sementes de jabuticaba pode ser devido à formação de embriões por apomixia, os quais geram plântulas clones da planta matriz. A autora acredita que o sistema de reprodução da jabuticabeira pode ser do tipo misto, que inclui além da apomixia, a geração de plântulas por fecundação cruzada e autofecundação.

Apesar do uso de diferentes métodos de desinfestação, não houve diferenças significativas no crescimento *in vitro* das plântulas de *P. peruviana* (Tabela 4). A altura média da parte aérea foi de 2,26 cm, semelhante ao encontrado por Wagner Júnior et al. (2011) de 2,45 cm. Enquanto Santos et al. (2019) obtiveram média superior para *Plinia jabuticaba* (Vell.) Berg de 5,69 cm em meio de cultivo líquido e 4,25 cm em meio semi-sólido, podendo a suplementação com MS/2 ter favorecido o desenvolvimento. O número médio de folhas obtido foi de 1,98, enquanto Wagner Júnior et al. (2006) utilizando sementes de jabuticaba classificadas entre 6-8 mm, obtiveram número de folhas de 1,78 após 46 dias de cultivo *ex vitro*.

Na propagação *in vitro*, plântulas que desenvolvem maior número de segmentos nodais ou gemas axilares como fonte de propágulos são preferidas (TORRES et al., 1998), onde se obteve no presente trabalho após 60 dias de

Tabela 4. Altura da maior parte aérea (cm), número de folhas, número de nós caulinares, número de raízes e comprimento da maior raiz (cm), obtidos a partir da germinação *in vitro* de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts após as sementes serem submetidas a diferentes métodos de desinfestação aos 60 dias após inoculação.

DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES	Parte aérea (cm)	Nº de folhas	Nº de nós caulinares	Nº de raízes	Raiz (cm)
T1	2,30	1,7	3,04	2,28	5,36
T2	2,13	1,8	3,28	2,28	5,38
T3	2,27	2,16	3,14	2,12	5,14
T4	2,44	2,52	2,98	2,40	5,01
T5	2,17	1,68	2,60	2,12	5,46
Média	2,26 ns	1,98 ns	3,01 ns	2,24 ns	5,27 ns

* ns: Não significativo. **T1:** Álcool 70%/ Água ultrapura autoclavada; **T2:** Álcool 70%/ NaOCl 1,25% 10 min./ Água ultrapura autoclavada; **T3:** Álcool 70%/ NaOCl 1,25% 20 min./ Água ultrapura autoclavada; **T4:** Álcool 70%/ NaOCl 2,5% 10 min./ Água ultrapura autoclavada; **T5:** Álcool 70%/ NaOCl 2,5% 20 min./ Água ultrapura autoclavada.

inoculação uma média de 3,01 nós caulinares por semente. A média de raízes para jabuticabeira foi de 2,24 enquanto Santos et al. (2019) obtiveram média inferior para *P. jabuticaba* (Vell.) Berg, com formação de raízes de 0,80 e 0,65 em meio de cultivo líquido ou semisólido, respectivamente.

O tamanho médio da raiz obtido foi de 5,27 cm, enquanto Alexandre et al. (2006) ao testar a germinação das sementes de *Plinia jabuticaba* (Vell.) Berg oriundas de três estádios de maturação obteve média de raízes de 4,67 cm (fruto firme e parcialmente maduro), 5,19 cm (fruto firme e maduro) e 4,63 cm (fruto coletado do solo e sem firmeza). A escolha do estágio de maturação do fruto utilizado em testes de germinação é crucial para garantir o desenvolvimento fisiológico com máximo de expressão de vigor (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). No presente estudo, utilizaram-se frutos firmes e maduros obtendo-se resultado semelhante ao encontrado por Alexandre e colaboradores ao utilizar o fruto nesse estágio de maturação.

3.2 Indução da calogênese *in vitro*

A formação de calos iniciou-se aproximadamente aos 30 dias após a inoculação em meio de cultivo. As diferentes concentrações hormonais influenciaram significativamente nos percentuais de calogênese em segmentos

nodais e discos foliares. Para segmentos nodais o desenvolvimento de calos iniciou-se nas regiões do corte e gemas axilares, ocorrendo na ausência ou presença de reguladores de crescimento com média geral de calogênese de 71,66% (Figura 1). O maior percentual de calos foi no tratamento controle (T1) com 90%, não diferindo dos meios de cultivo suplementados com 2,70 μM ANA + 0,22 μM BAP (T2 – 80%) e 5,40 μM ANA+ 0,44 μM BAP (T3 - 85%), nos demais tratamentos os percentuais foram inferiores e variaram de 45 a 70%. O melhor desenvolvimento visual, ou seja, os maiores calos ocorreram em T2 e T3.

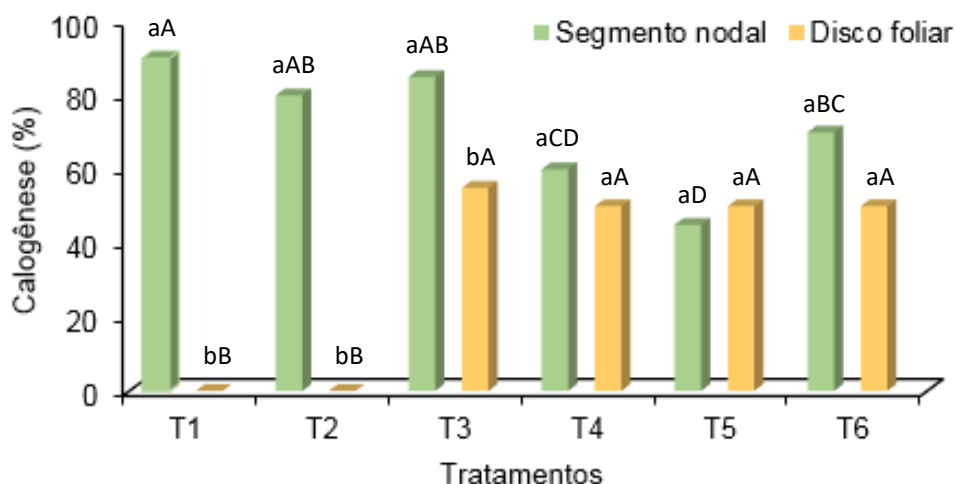


Figura 2. Calogênese em *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, obtido a partir de segmentos nodais e discos foliares após serem submetidos a diferentes concentrações hormonais. **T1:** Controle (sem reguladores de crescimento); **T2:** 2,70 μM de ANA + 0,22 μM de BAP; **T3:** 5,40 μM de ANA + 0,44 μM de BAP; **T4:** 8,1 μM de ANA + 0,66 μM de BAP; **T5:** 10,80 μM de ANA + 0,88 μM de BAP; **T6:** 13,5 μM de ANA + 1,1 μM de BAP. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, dentro de diferentes explantes, e maiúsculas, dentro dos mesmos explantes, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Stefenon et al. (2020) corroboram ao estudar a calogênese em segmentos nodais de *Eugenia uniflora* L., no qual obtiveram calos tanto na ausência como presença de reguladores de crescimento, e alguns desses calos apresentaram características embriogênicas. O aumento nas concentrações dos reguladores de crescimento no meio de cultura, não implica, necessariamente, no melhor desenvolvimento de *Saccharum officinarum* L., havendo um limite sutil entre a indução e a inibição, o que é específico para cada espécie vegetal (VIEIRA et al., 2009).

Para discos foliares o desenvolvimento de calos iniciou-se na região do corte e próximo à nervura principal, e foi dependente da adição de hormônios exógenos em meio de cultivo, em concentrações iguais ou superiores de 5,40 μM ANA + 0,44 μM BAP (T3) com média geral de calogênese de 34,16% (Figura 1). Semelhante ao observado no presente estudo, não houve a formação de calos na ausência de reguladores de crescimento em explantes foliares de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae), *Theobroma grandiflorum* Schum. (Malvaceae), *Calotropis gigantea* R.Br. (Apocynaceae) e *Salix humboldtiana* Willd. (Salicaceae). Os autores relatam a importância dos reguladores de crescimento na indução à desdiferenciação celular, os quais muitas vezes são necessários (LEDO et al., 2002; LANDA et al., 2000; ROY et al., 2000; SANTOS et al., 2005).

O maior percentual de calos em discos foliares foi obtido utilizando 5,40 μM ANA + 0,44 μM BAP (T3 - 55%), não diferindo significativamente de 8,1 μM ANA + 0,66 μM BAP (T4); 10,80 μM ANA + 0,88 μM BAP (T5); 13,5 μM ANA + 1,1 μM BAP (T6) com 50% de calogênese. Nos tratamentos com maiores doses hormonais (T4 a T6) o desenvolvimento dos calos foi mais vigoroso, diferentemente do que foi observado em segmentos nodais. De maneira geral, combinações de ANA + BAP são favoráveis à calogênese, especialmente quando a proporção de auxina for mais elevada em relação à citocinina (SANTOS et al., 2005; LANDA et al., 2000).

Golle et al. (2020b) ao avaliar o efeito de diferentes reguladores de crescimento, isolados ou em combinação (2,4-D, ANA e BAP) sobre a calogênese em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. obtiveram percentuais semelhantes ao encontrado no presente estudo, com desenvolvimento de calos em todos os tratamentos com média geral de 64,8%. Enquanto para Silveira et al. (2020) a calogênese em *P. peruviana* foi de até 42,5 e 22,5%, ao utilizar o 2,4-D e Picloram, respectivamente.

Ao comparar o crescimento de calos em segmentos nodais e discos foliares dentro da mesma concentração de reguladores de crescimento, houve diferença significativa nos tratamentos T1 (90 e 0%), T2 (80 e 0%) e T3 (85 e 55%). Enquanto para os tratamentos T4 (60 e 50%), T5 (45 e 50%) e T6 (70 e 50%) não houve diferença, com percentuais expressos para segmentos nodais e discos foliares, respectivamente. As porcentagens de calogênese foram melhores quando se

utilizou como fonte de explantes segmentos nodais, porém os calos foram visualmente maiores nos discos foliares.

De maneira geral, os calos formados apresentaram características bem variadas independente do meio de cultivo e explante utilizado, em sua maioria compactos e alguns friáveis, com coloração variando desde o branco, amarelo-claro, verde-claro até o marrom-claro ou escuro, respectivamente (Figura 2 – A, B, C e D). A formação de calos está fortemente associada à dediferenciação celular, embora a formação de calos deva ser considerada adequadamente como um tipo de transdiferenciação celular coordenada por respostas ao estresse, hormônio e desenvolvimento. A interação entre os tecidos do explante e as condições de cultura resulta em calos com morfologias diversas, bem como comportamentos distintos no desenvolvimento posterior (FEHÉR, 2019).

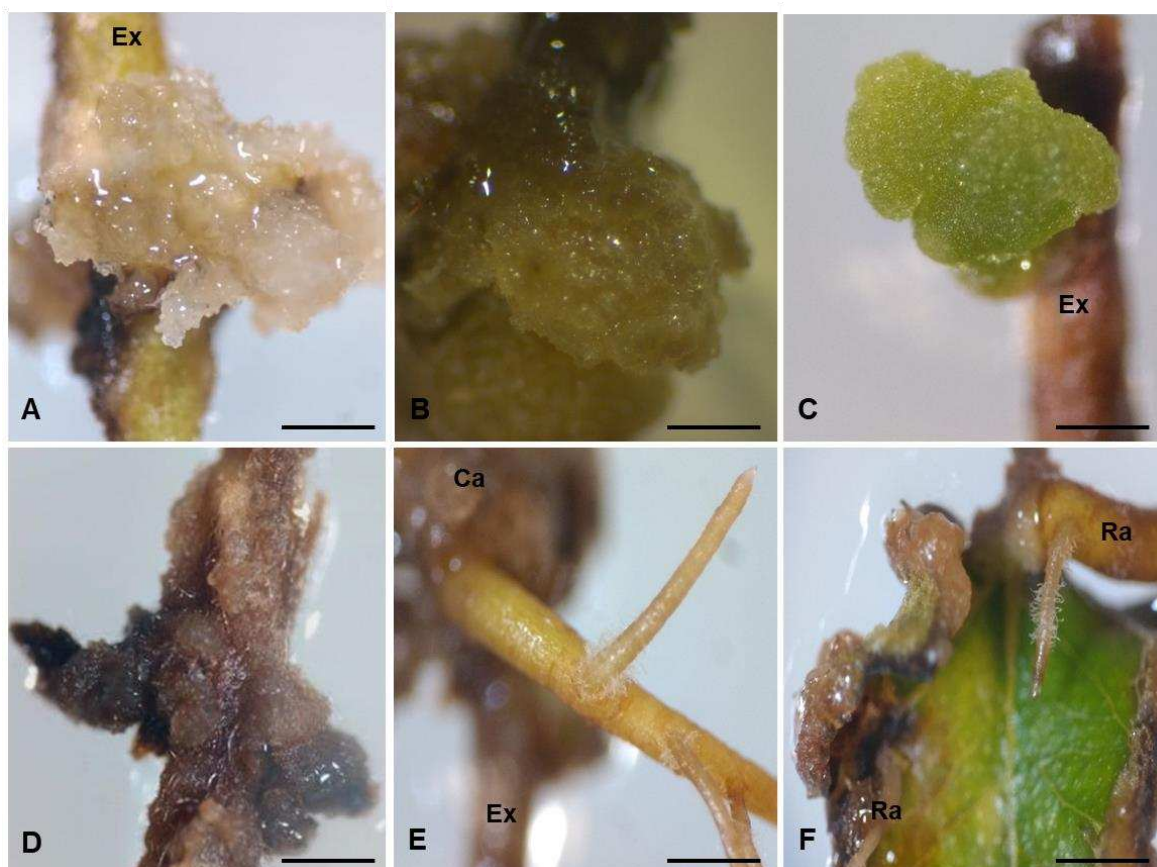


Figura 3. Calogênese e rizogênese *in vitro* de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts obtida a partir de segmentos nodais (A, B, C, D, E) e discos foliares (F) de plântulas germinadas *in vitro*, em meio de cultivo suplementado com 5,40 μM de ANA + 0,44 μM de BAP (A, B, F), 8,1 μM de ANA + 0,66 μM de BAP (C), 13,5 μM de ANA + 1,1 μM de BAP (D) e 2,70 μM de ANA + 0,22 μM de BAP (E) aos 60 e 100 dias após inoculação, para calogênese e rizogênese, respectivamente. Abreviações: (Ca) calo; (Ex) explante; (Ra) raiz. Barras = A, B, C e D: 0,2 cm; E e F: 0,4 cm.

Aos 90 dias de cultivo, aproximadamente, iniciou-se a formação de raízes a partir dos calos (Figura 2 – E e F). A formação de raízes adventícias é um processo complexo, pois envolve múltiplos fatores endógenos da planta, reguladores de crescimento e fatores ambientais (SORIN et al., 2005). Além disso, esse resultado enfatiza a teoria referente ao balanço entre reguladores de crescimento, no qual se espera que concentrações elevadas de auxinas induzam à rizogênese, servindo como parâmetro para avaliar a capacidade morfogênica dos explantes (HINOJOSA, 2000).

Os calos apresentaram características não embriogênicas, com células parenquimáticas grandes, desorganizadas e vacuolizadas (Figura 3). Calos embriogênicos e não embriogênicos diferem não apenas em sua morfologia externa e comportamento durante a cultura *in vitro*, mas também em características celulares e fisiológicas. Células grandes, com vacúolo proeminente e baixa razão núcleo/citoplasma são características de calos não embriogênicos (SHANG et al., 2009; SILVEIRA et al., 2013). Em contrapartida, calos embriogênicos são caracterizados por apresentar células de citoplasma denso, redondas, compactas, organizadas e de pouca vacuolização (FEHÉR, 2005). Além disso, é possível observar no corte histológico o desenvolvimento de raiz a partir do calo (Figura 3 – B).

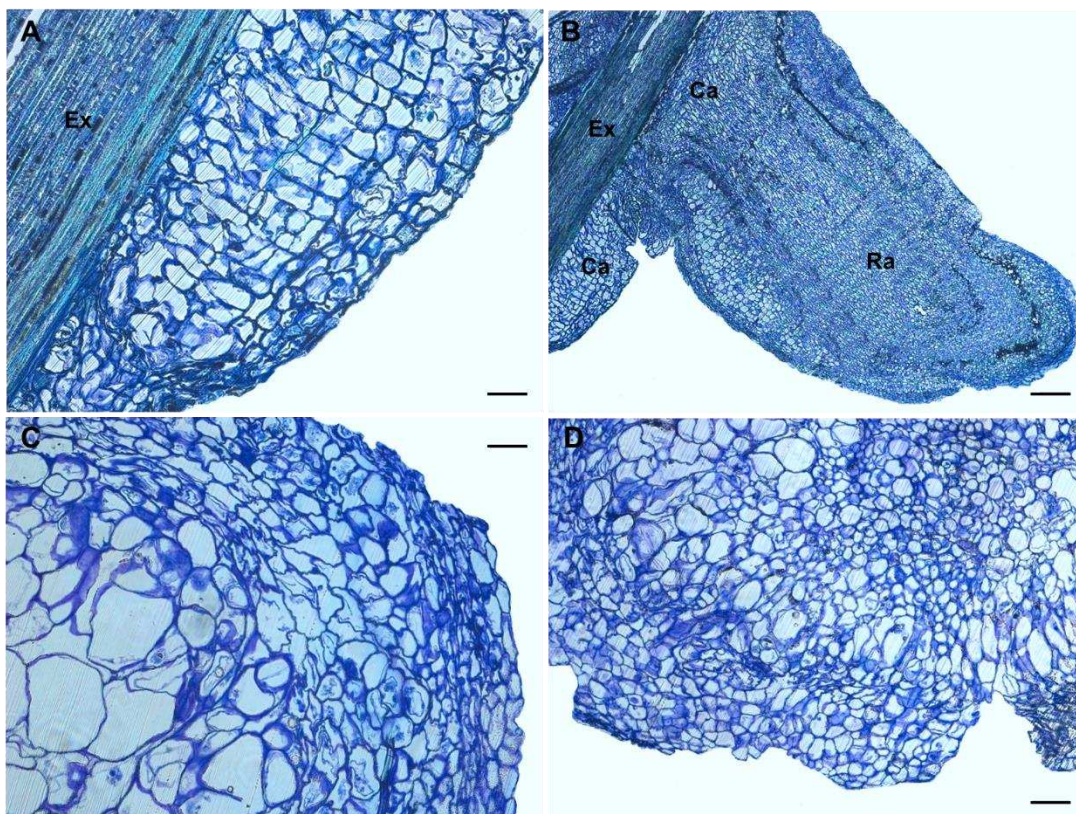


Figura 4. Aspectos histológicos de calos obtidos a partir de segmentos nodais e discos foliares de plântulas germinadas *in vitro* de jaboticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts). **A e B:** Cortes histológicos de calos não embriogênicos obtidos a partir de segmentos nodais em meio de cultura contendo 2,70 μM de ANA + 0,22 μM de BAP (T2). **C e D:** Cortes histológicos de calos não embriogênicos obtidos a partir de discos foliares em meio de cultura contendo 8,1 μM de ANA + 0,66 μM de BAP (T4). Abreviações: (**Ca**) calo; (**Ex**) explante; (**Ra**) raiz. Barras = **A:** 50 μm ; **B:** 500 μm ; **C:** 50 μm ; **D:** 100 μm .

3.3 Calos rizogênicos em segmentos nodais e discos foliares

As diferentes concentrações de reguladores de crescimento influenciaram significativamente nos percentuais de calos rizogênicos em segmentos nodais (Figura 4), ocorrendo na sua ausência ou presença com média de rizogênese de 25,83%. O maior percentual obtido foi quando o meio de cultivo foi suplementado com 2,70 μM de ANA + 0,22 μM de BAP (T2 – 65%), não diferindo ao ser utilizado 5,40 μM de ANA + 0,44 μM de BAP (T3 – 40%). Nos demais meios de cultivo os percentuais foram inferiores e variaram de 5 a 25%, inferindo que as maiores concentrações hormonais não implicam necessariamente nos melhores resultados, havendo um limite sutil entre a indução e inibição, como já relatado anteriormente.

Em relação a formação de raízes em calos oriundos de discos foliares (Figura 4), não houve diferença significativa entre as concentrações hormonais testadas. As estruturas radiculares originaram-se quando se utilizou concentrações iguais ou maiores que 5,40 μM de ANA + 0,44 μM de BAP (T3) com média geral de 10%, resultado inferior ao encontrado em segmentos nodais. Quando o meio de cultivo foi suplementado com 5,40 μM de ANA + 0,44 μM de BAP (T3) e 10,80 μM de ANA + 0,88 μM de BAP (T5) o percentual de calos rizogênicos foi de 20%. Nos demais tratamentos foram de 5 e 15%, ao ser adicionado ao meio 13,5 μM de ANA + 1,1 μM de BAP (T6) e 8,1 μM de ANA + 0,66 μM de BAP (T4), respectivamente. Golle et al. (2020a) ao utilizar discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. em meio de cultura com adição de 10 μM de ANA, obteve calos rizogênicos em 33,3% dos explantes após 90 dias de inoculação. Em contrapartida, ao adicionar diferentes combinações de ANA e BAP não houve rizogênese.

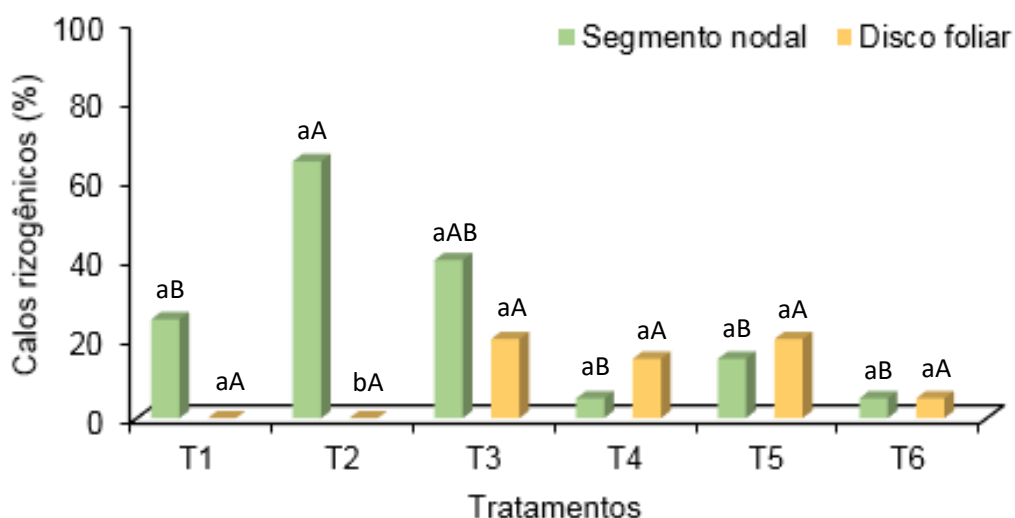


Figura 5. Calos rizogênicos em *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts obtidos aos 100 dias após inoculação, a partir de segmentos nodais e discos foliares ao serem submetidos a diferentes concentrações hormonais. **T1:** Controle (sem reguladores de crescimento); **T2:** 2,70 μM de ANA + 0,22 μM de BAP; **T3:** 5,40 μM de ANA + 0,44 μM de BAP; **T4:** 8,1 μM de ANA + 0,66 μM de BAP; **T5:** 10,80 μM de ANA + 0,88 μM de BAP; **T6:** 13,5 μM de ANA + 1,1 μM de BAP. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, dentro de diferentes explantes, e maiúsculas, dentro dos mesmos explantes, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Ao comparar o crescimento de calos rizogênicos em diferentes explantes dentro da mesma dose hormonal, houve diferença significativa apenas no tratamento 2 (65 e 0%). Para o tratamentos 1 (25 e 0%), T3 (40 e 20%), T4 (5 e

15%), T5 (15 e 20%) e T6 (5 e 5%), não houve diferença com percentuais expressos para segmentos nodais e discos foliares, respectivamente (Figura 4). Além disso, em alguns casos, as raízes surgiram diretamente dos explantes, evidenciando a ocorrência de organogênese direta (LEMOS, 2015). Taiz e Zeiger (2004) correlacionam a formação de raízes adventícias a atividades auxínicas, e no presente estudo pode ser pelo fato da maior relação auxina:citocinina no meio de cultivo.

A formação de raízes mostrou a existência de determinação e competência celular para uma nova formação de estruturas organizadas denominadas órgãos (TERMIGNONI, 2005), sendo possível a morfogênese a partir de calos de jabuticabeira. Estes resultados podem servir como referência para a rizogênese da espécie, visto a dificuldade de enraizamento através dos métodos convencionais de propagação vegetativa.

Segundo Fett-Neto et al. (2001) a rizogênese adventícia é um fator essencial nos processos de propagação vegetativa, sendo que, reguladores de crescimento, estado nutricional, características genéticas e componentes fenólicos, atuam de forma marcante sobre estas rotas. Adicionalmente, as estruturas radiculares formadas a partir dos calos, além de assépticos são extremamente juvenis, e podem ser utilizados como fonte de explantes para o cultivo *in vitro*. Hu et al. (2008) e Vilela et al. (2019) ao estudarem a micropropagação de *Lycium barbarum* L. e *Elaeis guineenses* Jacq. observaram a formação de calos embriogênicos a partir do cultivo de raízes.

4 CONCLUSÃO

Não há necessidade de uso de NaOCl para o estabelecimento *in vitro* de plântulas de jabuticabeira, indicando-se assim, o álcool 70% e a água ultrapura autoclavada (T1) para desinfestação das sementes com germinação de 98%.

Para calogênese e rizogênese em segmentos nodais indica-se o uso de 2,70 μM de ANA e 0,22 μM de BAP (T2) em meio de cultura. O percentual de formação de calos e raízes adventícias nesse tratamento foi de 80 e 65%, respectivamente.

Em discos foliares indica-se o uso de 8,1 μM de ANA + 0,66 μM de BAP (T4) para calogênese, e o uso de 5,40 μM de ANA + 0,44 μM de BAP (T3) para

rizogênese. O percentual de formação de calos e raízes adventícias nesses tratamentos foi de 50 e 20%, respectivamente.

Houve formação de raízes diretamente a partir dos explantes (organogênese direta) ou indiretamente a partir dos calos (organogênese indireta). Calos obtidos não apresentam potencial embriogênico.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, B. R.; PINELA, J.; BARROS, L., M.; BEATRIZ, P. P.; OLIVEIRA, B. P. P.; FERREIRA, C. F. R. I. Anthocyanin-rich extract of jaboticaba epicarp as a natural colorant: Optimization of heat- and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. **Food Chemistry**, p. 316. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126364>

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, n. 2, p. 227-230. 2006.

BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; COLLIN, M.; ESCOUTE, J.; LARTAUD, M.; VERDEIL, J. L.; ENGELMANN, F. Histochemical analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation dehydration. **Protoplasma**, v. 251, p. 177-189. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0536-5>

BARRAL, M. T.; PARADELO, R. A review on the use of phytotoxicity as a compost quality indicator. **Dyn Soil Dyn Plant**, v. 5, p. 36-44. 2011.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed., Jaboticabal: Funep, p. 588. 2012.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, n.3, p.271-276. 2013. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>

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**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 530-532. 2006.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JUNIOR, A. A.; ASSMANN, A. P.; DANNER, M.A., CITADIN, I., SASSO, S.A.Z., AMBROSIO, R., WAGNER JÚNIOR, A. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1, p. 246-252. 2011. DOI: [10.1590/S0100-29452011005000037](https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000037)

DIAS, M. A.; LOPES, J. C.; SOUZA NETO, J. D.; HEBERLE, H. Influência da temperatura e substrato na germinação de sementes de jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). **Idesia (Chile)**, v. 29, n. 1, p. 23-27. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292011000100004>.

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

ESPOSITO-POLESI, N. P. Contaminação *versus* manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia**, 71:e00562018. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071072>

FEHÉR, A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 536. 2019. DOI:10.3389/fpls.2019.00536

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

FETT-NETO, A. G. et al. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globules*. **Tree physiology**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 457-464. 2001.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, S. M.; SERROTE, C. M. L. Fitorreguladores na calogênese e rizogênese em *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 40, e201901908, p. 1-9. 2020a. DOI: <http://doi.org/10.4336/2020.pfb.40e201901908>

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, S. M.; SERROTE, C. M. L.; RABAIOLLI, S. M. S.; SILVA, K. B. Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 898-906. 2020b.

GUPTA, N.; JAIN, V. JOSEPEH, M.R.; DEVI, S. A Review on Micropropagation Culture Method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, India, v. 8, n. 1, p. 86-93. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653>

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. (Propagation: principles and practices. **Publishing company Prentice Hall**. New Jersey, 8. Ed. 2011.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen. p. 15-53. 2000.

HU, Z. et al. Callus production, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum* root explans. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 52, n. 1, p. 93-96. 2008.

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n. 1, p. 422-433. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>

LANDA, F. S. L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 24, 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.

LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Embrapa-CNPq. 4. ed., p. 70. 2015.

LIMA, A. P. P. S.; BASTOS, F. J. O.; LIMABRITO, A.; FERNANDES, G. B.; SANTANA, J. R. F. Modulação do meio de cultura na conservação *ex situ* de *Neoregelia mucugensis* Leme (Bromeliaceae). **Revista Caatinga**, v. 34, n. 4. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252021v34n403rc>

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

NAKAGAWA, J. Testes de Vigor Baseados no Desempenho das Plântulas In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Abrates (Londrina), p. 2.1-2.24. 1999.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373. 1964.

PALÚ, E. G.; CORRÊA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Use of antibiotics for the control of endogenous bacteria aiming at the micropropagation of the fig tree. **Brazilian Journal of Fruticulture**, v. 33, n. 2, p. 587- 592. 2011.

PARANHOS, J. T.; LÖBLER, L.; CECHIN, J., FERNANDES, T. S., FAO, E.; SORIANI, H. H. Propagação *in vitro* de *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 4, pág. 1191-1199. 2017. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509830301>

PAZ, L. et al. Phytotoxic Effects of African Mahogany Seedlings to Herbicides. **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 4. 2018.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J., FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jaboticabeira. **Scientia Agraria**, v.8, n. 1, p.19-23. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rfa.v8i1.8337>

ROSSA, Ü. B.; TRICHES, G. P.; GROSSI, F.; NOGUEIRA, A. C.; REISSMANN, C. B.; RAMOS, M. R. Germinação de sementes e qualidade de mudas de *Plinia trunciflora* (jaboticabeira) em função de diferentes tratamentos pré germinativos. **Floresta**, v. 40, n. 2, p. 371-378. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v40i2.17832>

ROY, A. T.; KOUTOULIS, A.; DE, D. N. Cell suspension culture and plant regeneration in the latex-producing plant, *Calotropis gigantean* (Linn.) R. Br. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 15-22. 2000.

SALLA, V. P. **Apomixia determinando a estrutura genética de uma população de *Plinia cauliflora* no sudoeste do paraná**. Dissertação de mestrado. Pato Branco. 2016.

SANTOS, D. S.; OLIVEIRA, L. O.; BEISE, D. C.; MACHADO, L. O.; STEFENON, V. M. Biotechnology in *Plinia* spp. needs and perspectives for a neglected group of fruit species. **Biociência Vegetal**, v. 21, n. 1, p. 3 – 14. 2021.

SANTOS, B. R. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p.510-514. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000300004>

SANTOS, S. K.; LUNA, N. P.; DA COSTA JÚNIOR, O.; DIAS, M.; GOMES, D.; FONSECA, K. Germination *in vitro* of Jaboticabeira *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 35, n. 6, p.1-8. 2019. DOI: <https://doi.org/10.9734/jeai/2019/v35i630221>

SHANG, H.; LIU, C.; ZHANG, C.; LI, F.; HONG, W.; LI, F. Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between 55 *Agrobacterium* transformed embryogenic and non-embryogenic calli of cotton. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, n. 5, p. 456-465. 2009.

SILVEIRA, S. S.; SANTOS, B. F. S.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from mature split seeds of jaboticaba (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts). **Acta Scientiarum**, v. 42, n. 1: e43798. 2020. DOI: 10.4025/actasciagron.v42i1.43798.

SILVEIRA, V.; VITA, A. M.; MACEDO, A. F.; DIAS, M. F. R.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 114, n. 3, p. 351-64. 2013.

SORIN, C. et al. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 17, n. 5, p. 1343 – 1359. 2005.

STEFENON, V. M.; PINHEIRO, M. V. M.; FREITAS, F. R.; SILVA, V. J. B.; VIEIRA, P. B.; SANTOS, D. D.; GUERRA, M. P. *In vitro* callogenesis for the induction of somatic embryogenesis and antioxidant production in *Eugenia uniflora*. **Biociência Vegetal**, v. 20, n. 2, p.135-146. 2020.

TAIZ, L.; ZAYGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed. p.119. 2004.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, p. 182. 2005.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, v.1, p. 184-185. 1998.

VIEIRA, R. A. et al. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades rb867515 e rb855156 de cana-de açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 122-126. 2009.

VILELA, M. S. P.; ANDRADE, J. C.; SANTOS, R. S.; STEIN, V. C.; PAIVA, L. V. Histological analysis of indirect somatic embryogenesis induced from root explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 43, n. 1. 2019.

WAGNER JÚNIOR, A.; SILVA, J. O. C.; PIMENTEL, L. D.; NEGREIROS, J. R. S.; ALEXANDRE, R. S.; MORGADO, M. A. D.; ÁLVARES, V. S.; BRUCKNER, C. H. Germinação e emergência de três espécies de jabuticabeira em quatro substratos. **Revista Ceres**, v. 53, n. 307, p. 322-327. 2006.

WAGNER JÚNIOR, A.; SILVA, J. O. C.; PIMENTEL, L. D.; SANTOS, C. E. M.; BRUCKNER, C.H. Germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de jabuticabeira em função do tamanho de sementes. **Acta scientiarum**, v. 33, n. 1, p.105-109. 2011. DOI: 10.4025/actasciagron.v33i1.4881

6 CAPÍTULO III

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM *Plinia peruviana* (POIR.) GOVAERTS (MYRTACEAE)

RESUMO

Myrtaceae é considerada uma importante família da flora brasileira a ser explorada comercialmente. Dentre as espécies da família encontra-se *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts conhecida popularmente como jabuticabeira, com frutos ricos em compostos fenólicos que conferem as jabuticabas propriedades medicinais. Ainda não foram estabelecidos métodos eficientes de propagação para a espécie, que assegurem a formação de pomares comerciais em curto espaço de tempo. Assim, o presente estudo teve por objetivo estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática a partir de explantes obtidos de sementes maduras de *P. peruviana*, bem como realizar a caracterização morfoanatômica e ultraestrutural de calos e/ou embriões somáticos. Foram testadas três concentrações de 2,4-D: 10; 20 e 30 μM em quatro tempos de exposição: 1, 3, 5 e 7 dias, além do tratamento controle. A formação de embriões somáticos ocorreu de maneira direta e assíncrona, e foi dependente da adição de 2,4-D em meio de cultura. A concentração de 20 μM de 2,4-D por 5 dias de exposição (T8) promoveu o maior percentual de formação (26,66%). Houve anormalidades morfológicas com embriões fusionados, além da ausência e formação de apenas um ou múltiplos cotilédones. Para calogênese a concentração de 20 μM de 2,4-D por 1 dia de exposição (T6) promoveu o melhor percentual de formação (20%), com calos com morfologia e coloração diversa. A partir das análises microscópicas foi possível caracterizar os embriões em diferentes estádios de desenvolvimento e identificar embriões anômalos, e os calos obtidos apresentam células não embriogênicas. O tratamento mais responsivo e indicado para formação de embriões somáticos foi o tratamento 8, e para calogênese o tratamento 6.

Palavras-chave: Embriões somáticos. Calos. Caracterização morfoanatômica e ultraestrutural.

1 INTRODUÇÃO

A jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts) é uma espécie nativa do Brasil e pertence à família Myrtaceae (SANTOS et al., 2021). Seus frutos são apreciados para consumo *in natura* ou processados (DUARTE; PAULL, 2015), sendo ricos em compostos fenólicos, que conferem as jabuticabas propriedades medicinais (CALLONI et al., 2015; BORGES et al., 2014; WU et al., 2012, 2013; ABE et al., 2012). A principal forma de propagação é por meio de sementes, porém há um longo período de juvenilidade que pode se estender por até 14 anos (CASSOL et al., 2015). Nas sementes ocorre poliembrionia e são classificadas como recalcitrantes (DUARTE; PAULL, 2015; HOSSEL et al., 2013; DANNER et al., 2011).

Ainda não foram estabelecidos métodos eficientes de propagação vegetativa, que assegurem a formação de pomares comerciais em curto espaço de tempo (DANNER et al., 2006). Os problemas relacionados à propagação vegetativa convencional da espécie referem-se à baixa taxa de enraizamento e ausência de estudos relacionados ao desenvolvimento a longo prazo das mudas a campo (CASSOL et al., 2015; SASSO et al., 2010a; SASSO et al., 2010b; DANNER et al., 2006; PEREIRA et al., 2005).

Por ser uma espécie não domesticada, os bancos de germoplasma da jabuticabeira são restritos a pequenas coleções de plantas em instituições de pesquisa, e não há a delimitação de clones com características agrônômicas superiores (WAGNER JÚNIOR et al., 2022). Adicionalmente, a escassez de programas de melhoramento está associada à alta variabilidade e diversidade genética das populações. Estudos englobando biologia molecular, formas de reprodução, caracterização de germoplasma e propagação vegetativa da jabuticabeira são necessários (CITADIN et al., 2010).

A cultura de tecidos surge como alternativa para produção de um grande número de plantas selecionadas (genótipos superiores), com boas condições fitossanitárias e em curto período de tempo (STEFENON et al., 2020a; PINHEIRO et al., 2019; PARANHOS et al., 2017). Dentre as técnicas utilizadas para a produção *in vitro* de plantas, a embriogênese somática pode ser utilizada como uma

alternativa para a propagação em larga escala de espécies recalcitrantes a outros métodos de propagação convencionais (PENG et al., 2020).

A embriogênese somática é um exemplo da alta plasticidade que as células vegetais exibem, onde a técnica explora o potencial morfogênico celular decorrente da exposição de diferentes fontes de explantes a condições de estresses e/ou reguladores de crescimento (STEFENON et al., 2020b; FEHÉR, 2015). Há uma correlação direta entre o grau de poliembrionia *in vivo* e respostas embriogênicas na cultura *in vitro*, sugerindo-se uma relação entre os genes expressos em espécies que apresentam poliembrionia e aqueles expressos durante a embriogênese somática (NAKANO et al., 2013). Assim, o processo de formação de embriões somáticos *in vitro* pode ser facilitado para jabuticabeira.

Análises morfoanatômicas e ultraestruturais constituem ferramentas importantes para otimização do desenvolvimento de protocolos de ES, podendo auxiliar na identificação de rotas morfogênicas, caracterização de eventos morfológicos e identificação da origem dos órgãos formados (ROCHA et al., 2016). Estas análises são importantes e podem servir para caracterização da morfologia normal ou anormal dos embriões formados, bem como sua origem uni ou multicelular. Permitem detectar anormalidades que acarretem a formação de embriões somáticos incapazes de converter em plântulas, tais como, fusão de dois ou mais embriões, falta de meristemas apicais e radiculares, múltiplos cotilédones, ausência ou cotilédones pouco desenvolvidos (PESCADOR et al., 2008; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004).

Há apenas um estudo publicado para a espécie em estudo, no qual o melhor tratamento de indução de embriogênese somática a partir de explantes obtidos de sementes maduras, foi em meio MS com 1000 mg L⁻¹ de glutamina e 10 µM de 2,4-D por 60 dias de exposição. Quando transferidos para meio de maturação a suplementação com 60 g L⁻¹ de PEG 6000 foi benéfica para promover um avanço nos estádios de desenvolvimento (SILVEIRA et al., 2020). Para outras espécies de jabuticabeira, como *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel o maior percentual de embriões somáticos foi com o uso de 15 µM de 2,4-D por 60 dias de exposição (OLIVEIRA et al., 2022). Em ambos os estudos, houveram anormalidades morfológicas (cotilédones fundidos ou formação de múltiplos cotilédones) e anatômicas (zonas

de cicatrização com acúmulo de compostos fenólicos e morte celular), e não houve conversão em plantas completas.

O presente estudo teve por objetivo estabelecer um protocolo de indução da embriogênese somática a partir de explantes obtidos de sementes maduras de *Plinia peruviana*, utilizando-se diferentes concentrações e tempos de exposição ao 2,4-D, bem como realizar a caracterização morfoanatômica e ultraestrutural de calos e/ou embriões somáticos formados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção e desinfestação do material vegetal

Para obtenção das sementes, frutos maduros foram coletados diretamente de uma planta adulta de jabuticabeira, sendo a coloração do epicarpo roxo escuro e o bom estado fitossanitário os critérios de seleção (Figura 1 – A). A polpa dos frutos foi eliminada manualmente a partir da lavagem em água corrente, sendo possível obter de uma a três sementes de diferentes tamanhos (Figura 1 – B). Realizou-se a desinfestação de aproximadamente 200 sementes em câmara de fluxo laminar, com etanol 70% agitando por dois minutos, e enxágue triplo em água ultrapura e autoclavada. Após esse processo as sementes foram seccionadas longitudinalmente com auxílio de bisturi e os cotilédones separados, mantendo-se o eixo embrionário que se encontra firmemente aderido. Desta forma, os explantes utilizados para indução da embriogênese somática foram definidos como sementes maduras divididas ao meio, contendo um cotilédone e um embrião resultante da fecundação (Figura 1 – C).

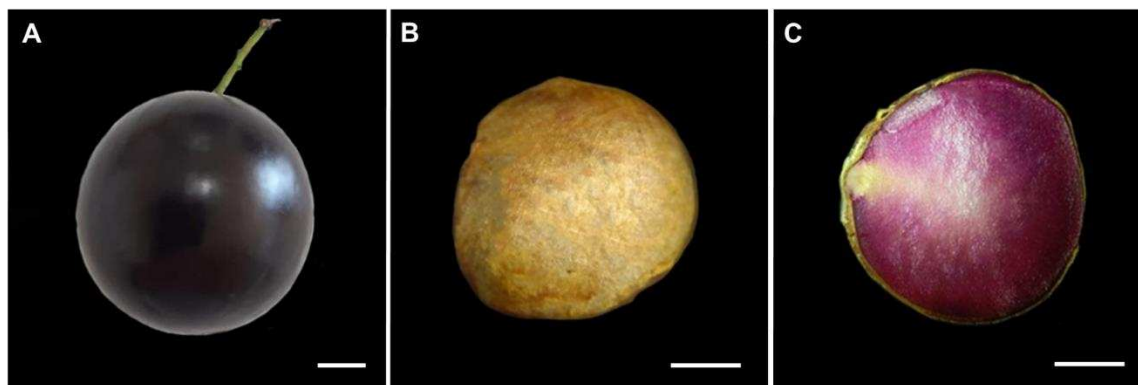


Figura 1. Aspectos do fruto e semente de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts. **A:** Fruto maduro com epicarpo roxo escuro. **B:** Semente inteira após o despulpamento. **C:** Semente dividida ao meio, contendo um cotilédone e um embrião resultante da fecundação, utilizado como explante para indução da embriogênese somática. Barras = **A:** 1 cm; **B e C:** 3 mm (Fonte: De autoria própria).

2.2 Indução da embriogênese somática

O meio de cultivo utilizado foi o MS1/2 (metade da concentração de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas) (MURASCHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar Bio Basic, 1 g L⁻¹ do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) e 1 g L⁻¹ de glutamina. Foram testadas diferentes concentrações de 2,4-D: 10; 20 e 30 µM em tempos distintos de exposição: 1, 3, 5 e 7 dias, além do tratamento controle caracterizado pela ausência do 2,4-D em meio de cultura (Tabela 1). Após esses períodos de exposição os explantes foram transferidos para um meio idêntico, somente sem a adição de 2,4-D.

O pH foi ajustado para 5,8 ±0,1 antes do meio ser semi-solidificado, e após autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 18 minutos. Em condições assépticas, os explantes foram desinfestados e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura (150 mm x 25 mm) com explantes oriundos da mesma semente por tubo de ensaio. Após transferidos para condições controladas de ambiente em BOD com temperatura de 25 ±1°C e mantidos no escuro.

Após 30 dias de inoculação os explantes foram transferidos para um meio de cultivo idêntico, e após 60 dias de inoculação em meio de indução, avaliou-se os percentuais de formação de calos e de embriões somáticos, eixos embrionários germinados, explantes contendo raízes, oxidação e contaminação.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para indução da embriogênese somática a partir de explantes obtidos de sementes maduras de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts.

Tratamentos	Concentrações hormonais e tempos de exposição
1	Controle (sem reguladores de crescimento)
2	10 μM de 2,4-D/ 1 dia
3	10 μM de 2,4-D/ 3 dias
4	10 μM de 2,4-D/ 5 dias
5	10 μM de 2,4-D/ 7 dias
6	20 μM de 2,4-D/ 1 dia
7	20 μM de 2,4-D/ 3 dias
8	20 μM de 2,4-D/ 5 dias
9	20 μM de 2,4-D/ 7 dias
10	30 μM de 2,4-D/ 1 dia
11	30 μM de 2,4-D/ 3 dias
12	30 μM de 2,4-D/ 5 dias
13	30 μM de 2,4-D/ 7 dias

2.3 Maturação dos embriões somáticos

Embriões somáticos em estágios iniciais de desenvolvimento foram utilizadas para os experimentos de maturação. O meio de cultivo foi o MS1/2 (MURASCHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar Bio Basic e 60 g L⁻¹ de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). Utilizou-se placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL de meio de cultura, que foram mantidos em condições controladas de ambiente em BOD com temperatura de 25 \pm 1°C e fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de aproximadamente 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a partir de lâmpadas fluorescentes brancas. Após 30 dias em meio de maturação, os embriões somáticos foram transferidos para meio de conversão.

2.4 Conversão dos embriões somáticos em plantas completas

Após o estágio de maturação os embriões somáticos foram transferidos para meio de cultivo com MS1/2 (MURASCHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar Bio Basic, 0,5 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2,90 µM de ácido giberélico (GA3) (esterilizado à frio e adicionado ao meio de cultivo após a autoclavagem). Foram mantidos em condições controladas de ambiente em BOD idênticas ao estágio de maturação. Após 30 dias em BOD, foi observada a taxa de conversão dos embriões somáticos.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi instalado em delineamento em esquema fatorial (3x4), onde os tratamentos analisados foram as diferentes concentrações (três) e tempos de exposição (quatro) ao 2,4-D, além do grupo controle (T1) caracterizado pela ausência do 2,4-D no meio de cultivo, constituindo 13 tratamentos. Cada tratamento com cinco repetições, sendo cada repetição composta por seis explantes, totalizando 390 explantes no experimento. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se programa estatístico Genes (CRUZ, 2013).

2.5 Análises anatômicas e ultraestruturais

Amostras de embriões somáticos e/ou calos a partir explantes obtidos de sementes maduras foram utilizados para análise anatômica e ultraestrutural.

Microscopia óptica de luz (MO)

As amostras obtidas 90 dias após a inoculação em meio de indução foram fixadas em formaldeído 4%, em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), à temperatura ambiente sob vácuo por 24h. Posteriormente foi realizada a lavagem no mesmo tampão por duas vezes, e após a desidratação em série etílica (40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) permanecendo por uma hora em cada concentração. Após as amostras foram pré-infiltradas em historresina: etanol 100% (1:1 v/v) durante 48 horas e, em seguida realizou-se a infiltração com resina de hidroxietil metacrilato (Leica

Historesina), seguindo as recomendações do fabricante. Cortes de 6 µm de espessura foram obtidos com uso de micrótomo rotativo (RM 2255, Leica), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C, e corados com azul de toluidina a 0,05% em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) (O'BRIEN et al., 1965). A análise e documentação fotográfica foram realizadas em microscópio óptico Zeiss equipado com software Guide ZEN 2 (blue edition).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os embriões somáticos obtidas aos 80 dias após a inoculação em meio de indução, foram submetidos a análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina. Para isso, foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) à vácuo durante uma semana. Após foi realizada a lavagem no mesmo tampão e desidratação em série etílica (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), durante 30 minutos em cada concentração, exceto o álcool etílico 100%, onde foram realizadas duas adições, de 30 minutos cada (adaptado de SCHMIDT et al. 2012). Após a desidratação, foram secas em ponto crítico de CO₂ modelo CPD 030 LEICA (Viena, Áustria) de acordo com Horridge e Tamm (1969). As amostras secas foram aderidas sobre suportes de alumínio (stubs) com auxílio de fita de carbono dupla face, e posteriormente foi realizado o recobrimento com 20 nm de ouro em metalizadora modelo EM SCD 500, LEICA (Viena, Áustria) (SCHMIDT et al., 2012). A análise e documentação fotográfica foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol® (Tóquio, Japão) modelo JSM-6390LV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução da embriogênese somática

Aos 10 dias em meio de indução, quase que imperceptíveis alterações morfológicas foram observadas nos explantes inoculados em meio suplementado com 2,4-D, limitando-se a um leve intumescimento. Aos 21 dias foi possível observar o início do desenvolvimento direto de embriões somáticos em estágio

globular, onde formaram-se na região do eixo embrionário dos explantes. A ES direta é geralmente a rota preferível, e apresenta algumas vantagens adicionais, como a redução do tempo necessário à propagação vegetal (EL BAR; EL DAWAYATI, 2014), bem como o decréscimo da ocorrência de variação somaclonal, indesejada na maioria dos métodos de propagação clonal (IBRAHIM et al., 2013; JAYANTHI et al., 2011).

No início do desenvolvimento os embriões somáticos apresentaram coloração esbranquiçada (Figura 2 - A, B, C e D), e seu processo ocorreu nitidamente de forma assincrônica, ou seja, a partir de um único explante foi possível observar o desenvolvimento de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento. Outros autores também reportaram essa forma de desenvolvimento para família Myrtaceae em *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007; CRUZ et al., 1990), *Myrciaria aureana* Mattos (MOTOIKE et al., 2007), *Myrtus communis* L. (CANHOTO et al., 1999) e *Psidium guajava* L. (AKHTAR, 2013, 2010).

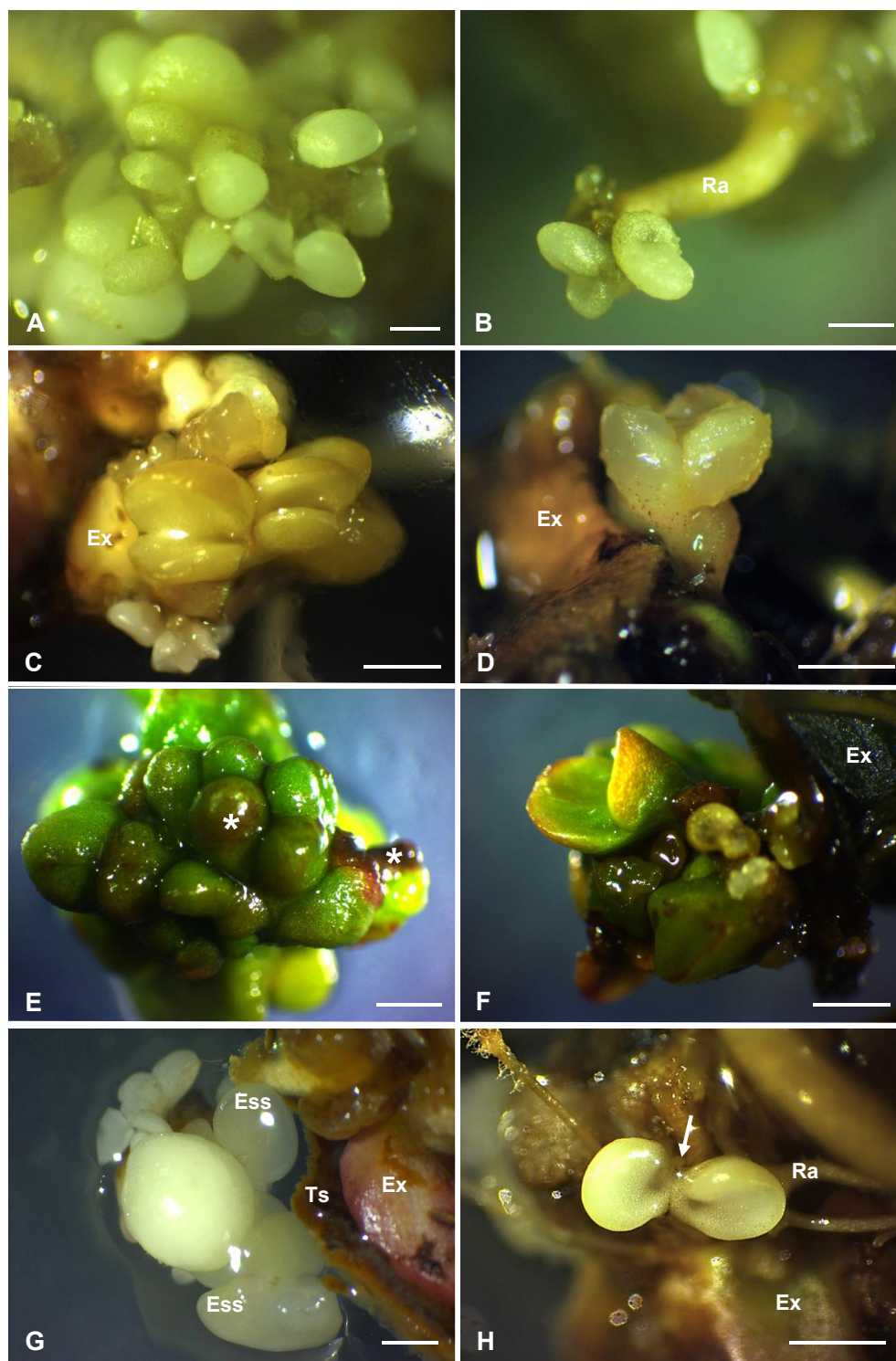


Figura 2. Embriogênese somática a partir de explantes obtidos de sementes maduras de jaboticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts), em meio de cultivo suplementado com 20 μ M de 2,4-D aos 30 (**A, B, C, D e H**), 60 (**G**) e 90 dias (**E e F**) após inoculação. **A, B, C, D, E e F:** Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. **E e F:** Coloração esverdeada e arroxeadas obtida pelos embriões somáticos após transferência para condições de luminosidade. **G:** Embriogênese somática secundária. **H:** Anormalidade morfológica apresentando a fusão de embriões somáticos na porção basal. Abreviações: (**Ex**) explante; (**Ra**) raiz; (**Ts**) tegumento da semente; (**Ess**) embrião somático secundário; (**seta**) anormalidade morfológica; (**asterisco**) antocianinas. Barras = 1 mm.

A embriogênese somática em jabuticabeira é dependente da adição de hormônios exógenos no meio de cultivo, ou seja, explantes de jabuticabeira introduzidos em meio de cultura sem a adição de 2,4-D não desenvolveram embriões somáticos (Tabela 2). A necessidade de auxinas para a indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos também foi observada para *Psidium guajava* L. (AKHTAR, 2013), *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (GUERRA et al., 2013; FRAGA et al., 2012), *Myrtus communis* L. (CANHOTO et al., 1999) e *P. peruviana* (SILVEIRA et al., 2020).

Tabela 2. Percentuais de embriões somáticos e calos a partir de explantes obtidos de sementes maduras de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, após serem submetidas a diferentes concentrações hormonais e tempos de exposição ao 2,4-D aos 60 dias após inoculação.

EXPOSIÇÃO AO 2,4-D	EMBRIÕES SOMÁTICOS (%)				
	Controle	10 µM 2,4-D	20 µM 2,4-D	30 µM 2,4-D	Média
1 dia	0	0	6,66 b	3,33	2,50 ns
3 dias	0	0	3,33 b	6,66	2,50 ns
5 dias	0 B	0 B	26,66 Aa	6,66 B	8,33
7 dias	0	6,66	6,66 b	3,33	4,16 ns
Média	0 ns	1,67 ns	10,83	5 ns	4,37

EXPOSIÇÃO AO 2,4-D	CALOS (%)				
	Controle	10 µM 2,4-D	20 µM 2,4-D	30 µM 2,4-D	Média
1 dia	0 B	0 B	20 A	33,33 A	13,33
3 dias	0 B	0 B	23,33 A	36,66 A	15
5 dias	0 C	10 BC	20 AB	33,33 A	15,83
7 dias	0 C	13,33 BC	26,66 AB	40 A	20
Média	0 ns	5,83 ns	22,50 ns	35,83 ns	16,04

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical, e maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ns: Não significativo.

Para *P. peruviana*, a permanência dos explantes por no mínimo 7 dias em 10 µM de 2,4-D foi necessária para desencadear as respostas embriogênicas. Ao ser utilizado concentrações maiores de 20 e 30 µM houve a formação de embriões somáticos independente do tempo de exposição, variando de 3,33 a 26,66% (Tabela 2). Para *Acca sellowiana* (Berg.) Burret e *Psidium guajava* L. o tempo mínimo de exposição para indução da ES é de 5 e 8 dias, respectivamente (RAI et al., 2007; GUERRA et al., 2001).

Ao comparar o percentual de embriões dentro da mesma dose hormonal, não houve diferença significativa quando utilizou-se 10 e 30 μM de 2,4-D, com média de 1,67 e 5%, respectivamente. Ao ser utilizado 20 μM houve interação entre os fatores testados, no qual o maior percentual obtido de embriões foi de 26,66% durante 5 dias de exposição (T8). Silveira e colaboradores (2020) ao utilizarem para *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts a mesma concentração durante 60 dias obtiveram um percentual relativamente maior de 57,5%, no entanto a maioria dos embriões apresentou anormalidades morfológicas.

Ao comparar o percentual de embriões somáticos dentro do mesmo período de exposição, não houve diferença significativa quando os explantes permaneceram por 1, 3 e 7 dias em meio de cultivo com 2,4-D, com média de 2,50, 2,50 e 4,16%, respectivamente. Ao permanecerem por 5 dias houve interação entre os fatores testados, no qual o maior percentual obtido de embriões somáticos foi de 26,66% ao ser utilizado 20 μM de 2,4-D (T8).

Observou-se, que ao ser utilizado 20 e 30 μM de 2,4-D independente do período de exposição, houve ocorrência de embriogênese somática secundária, caracterizada pela produção de embriões somáticos a partir de embriões somáticos primários. Os novos embriões formados eram translúcidos (Figura 2 - G) e formaram-se, principalmente, a partir de embriões em estádios iniciais de desenvolvimento (globular e cordiforme), sendo também formados em meio de maturação (ausente de 2,4-D). A ES secundária já foi descrita em algumas espécies da família Myrtaceae, como *Acca sellowiana* (Berg) Burret e *Psidium guajava* L. (BAJPAI et al., 2016; FRAGA et al., 2012). Esse tipo de embriogênese, comparativamente à embriogênese primária, apresenta as vantagens de melhorar as taxas de multiplicação, repetibilidade, independência da fonte de explante e manutenção da capacidade embriogênica por intervalos relativamente longos de tempo por meio de ciclos repetitivos de ES secundária (ROCHA et al., 2016).

Alguns embriões somáticos apresentaram anormalidades morfológicas com embriões fusionados (Figura 2 – H), além da ausência e formação de apenas um ou múltiplos cotilédones, principalmente em meio de indução com 2,4-D por 5 e 7 dias. O uso do 2,4-D pode ocasionar formação anormal dos embriões somáticos quando utilizado em altas concentrações e/ou períodos de exposição, interrompendo processos genéticos e fisiológicos normais em células tratadas com

esse regulador de crescimento (PESCADOR et al., 2008; GAJ, 2004). Desta forma, ensaios utilizando outros tratamentos de estresse para indução da embriogênese somática tornam-se necessários (GARCIA et al., 2019).

Aos 30 dias de cultivo, independente da concentração de 2,4-D e período de exposição, iniciou-se a formação de uma massa calogênica e o seu crescimento aconteceu na superfície de todo o explante. A calogênese foi dependente da adição de hormônios exógenos em meio de cultivo, em concentrações iguais ou superiores a 10 μM de 2,4-D durante 5 dias de exposição (T4) (Tabela 2). Não houve diferença significativa ao comparar o percentual de calos dentro da mesma concentração hormonal, no qual a média de calogênese quando utilizou-se 10, 20 e 30 μM foi de 5,83, 22,50 e 35,83%, respectivamente.

Em contrapartida, ao comparar o percentual de calos dentro do mesmo período de exposição houve interação entre os fatores testados. Concentrações de 20 e 30 μM de 2,4-D promoveram os maiores percentuais de calos que variaram de 20 a 40%, independente do período de exposição. Silveira et al. (2020) também obtiveram um aumento no percentual de calogênese em sementes de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts com o aumento da concentração de 2,4-D em meio de cultivo. As concentrações utilizadas variaram de 2,5 a 50 μM , e os maiores percentuais obtidos foram com 10, 25 e 50 μM .

Em relação a morfologia externa dos calos, a coloração variou desde o amarelo claro até o marrom claro e/ou escuro, em sua maioria com aparência compacta (Figura 3 – A, B e C). Os calos oriundos a partir do uso de 10 μM de 2,4-D, normalmente originaram massas calogênicas menores, em contrapartida, os obtidos a partir de 20 μM e 30 μM originaram massas calogênicas maiores. Após a transferência dos calos para luz aos 90 d.a.i., alguns adquiriram gradativamente coloração esverdeada.

Os calos apresentaram características não embriogênicas, com células parenquimáticas grandes, desorganizadas e vacuolizadas (Figura 3 - D). Calos embriogênicos e não embriogênicos diferem não apenas em sua morfologia externa e comportamento durante a cultura *in vitro*, mas também em características celulares e fisiológicas. Células grandes, com vacúolo proeminente e baixa razão núcleo/citoplasma são características de calos não embriogênicos (SILVEIRA et al., 2013).

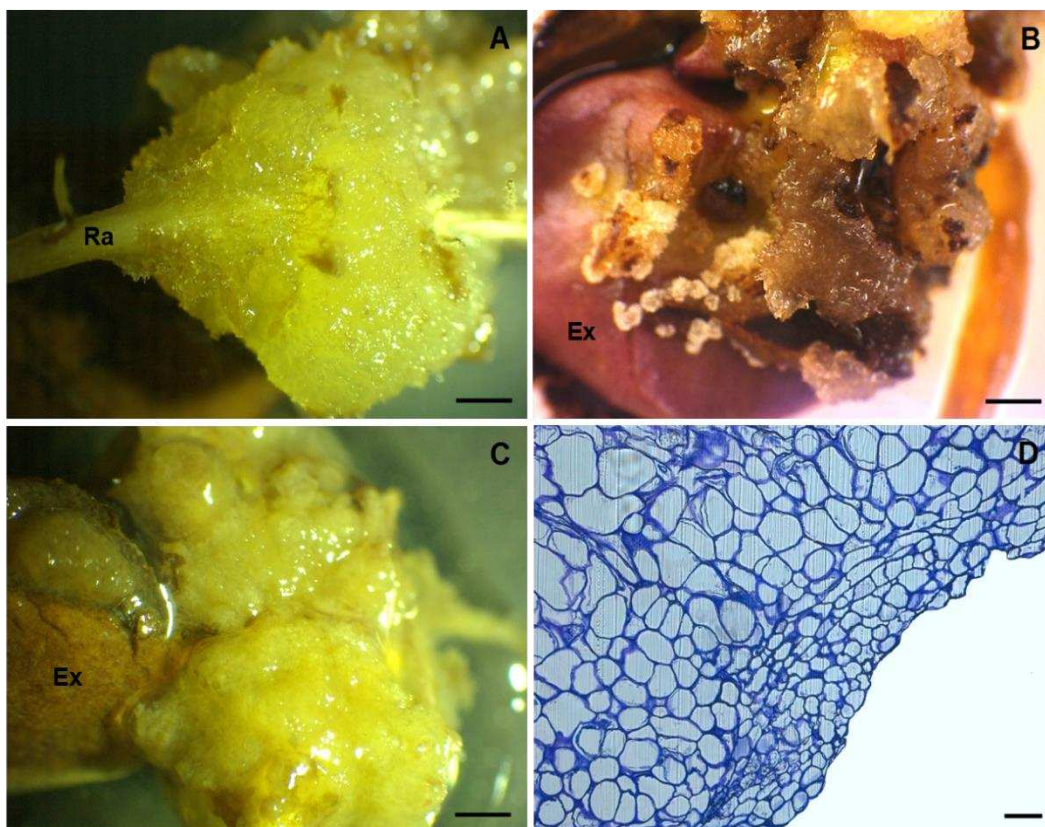


Figura 3. Aspectos morfológicos e histológicos de calos a partir de explantes obtidos de sementes maduras de jaboticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts), em meio de cultivo suplementado com 30 μ M de 2,4-D aos 40 (B) e 60 dias (A e C) após inoculação. A, B e C: Calos com morfologia e coloração diversa. D: Secção anatômica de calo representado pela letra C, evidenciando células com características não embriogênicas. Abreviações: (Ex) explante; (Ra) raiz. Barras = A, B e C: 5 mm; D: 50 μ m.

3.2 Maturação dos embriões somáticos

O meio de maturação utilizado foi benéfico para promover o desenvolvimento dos embriões somáticos de jaboticabeira. Observou-se uma redução na quantidade de embriões que permaneceram em estágio globular e um avanço na formação de embriões nos demais estádios de desenvolvimento, além do seu aumento de tamanho. O desenvolvimento dos embriões a estádios mais avançados pode ser atribuído ao uso do PEG 6000, considerado um agente osmótico que simula o estresse hídrico que ocorre naturalmente nas sementes nos estádios tardios da maturação (RUDIYANTO et al., 2014; STASOLLA et al., 2003). A condição de estresse hídrico estimula o desenvolvimento dos embriões somáticos mediante o aumento na concentração de solutos dentro da célula, levando ao acúmulo de produtos de reserva no embrião, como lipídios e proteínas

(NIC-CAN et al., 2016). O PEG 6000 promoveu a maturação de embriões somáticos de outras espécies da família Myrtaceae, a exemplo, *Myrciaria aureana* Mattos (MOTOIKE et al., 2007) e *Psidium guajava* L. (BAJPAI et al., 2016).

Os embriões somáticos ao serem transferidos para meio de maturação com PEG 6000 em condições de luminosidade, após aproximadamente 5 e 20 dias, passaram a adquirir de forma gradativa coloração esverdeada e arroxeadas, respectivamente (Figura 2 – E e F). A síntese de clorofila e antocianinas nas plantas pode ser induzida em resposta a estresses distintos, dentre eles, o estresse osmótico, que atua inibindo a divisão celular e estimulando a síntese de diferentes metabólitos secundários (KOVINICH et al., 2014). Adicional a isso, a jabuticabeira é reconhecida pela produção de antocianinas, visto que estes pigmentos são os principais constituintes da casca dos frutos (WU et al., 2013) e com importante propriedade antioxidante (ALBUQUERQUE et al., 2020).

3.3 Conversão dos embriões somáticos em plantas completas

O estágio de conversão é considerado crítico para a obtenção de plantas completas a partir da embriogênese somática para várias espécies (BAJPAI et al., 2016). Para jabuticabeira não houve desenvolvimento dos embriões somáticos mesmo após 120 dias de cultura, e ainda não há um protocolo de conversão estabelecido. A identificação das condições de cultura ideais para a embriogênese somática pode ser extremamente complexa devido ao grande número de fatores que contribuem para a indução, desenvolvimento e conversão dos embriões somáticos (GUTIÉRREZ-MORA et al., 2012). Importante enfatizar o uso do 2,4-D, um potente e usual regulador de crescimento, que permanece no tecido por longos períodos e pode ter acarretado o desenvolvimento anormal e não conversão de embriões somáticos de jabuticabeira.

Na família Myrtaceae, a espécie *Acca sellowiana* (Berg.) Burret é considerada referência em estudos de embriogênese somática, no qual as taxas de conversão variam de 10% a 35%, sendo o maior percentual alcançado ao ser utilizado um tratamento com pulso de 2,4-D por 1 hora. Os períodos maiores de exposição resultam em muitos embriões com morfologia anormal e, conseqüentemente, baixa taxa de conversão (PAVEI et al., 2018; FRAGA et al.,

2012; PESCADOR et al., 2008; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007). Dessa forma, uma possibilidade para indução da embriogênese somática para espécie em estudo seria a realização de um tratamento com pulso de 2,4-D.

3.4 Eixos embrionários germinados, explantes contendo raízes, oxidação e contaminação

Em todos os tratamentos houve eixos embrionários que não seguiram a rota da embriogênese somática, mas germinaram. Não houve diferença significativa ao comparar o percentual de eixos embrionários germinados dentro da mesma dose hormonal, no qual a média de germinação quando se utilizou 0, 10, 20 e 30 μM foi de 53,33, 32,50, 20 e 3,33%, respectivamente (Tabela 3). Ao comparar o percentual de EEG dentro do mesmo período de exposição houve interação entre os fatores testados, de maneira geral, o grupo controle (ausência de 2,4-D) e a menor concentração de 2,4-D (10 μM) promoveram os maiores percentuais de germinação que variaram de 30 a 53,33%, independente do período de exposição. Conforme a concentração de 2,4-D foi aumentando, foi observada menor porcentagem de germinação dos eixos embrionários. Em culturas de *Psidium guajava* L. também foi relatada maior germinação na ausência ou na presença de baixas concentrações de 2,4-D (AKHTAR, 2010).

Para as variáveis percentual de raízes, oxidação e contaminação não houve diferença estatística entre os tratamentos testados (Tabela 3). A formação de raízes a partir dos explantes ocorreu em todos os tratamentos, independente da concentração hormonal e do período de exposição ao 2,4-D. A média geral para essa variável foi de 69,17%, e em alguns casos, o surgimento de raízes a partir das sementes ocorreu em explantes que desenvolveram embriões somáticos e/ ou calos. Em alguns casos, houve o desenvolvimento de embriões somáticos a partir das raízes que emergiram diretamente nos explantes primários (metade da semente) (Figura 2 – B). Possivelmente, concentrações maiores ou tempos de exposição mais prolongados ao 2,4-D poderiam reduzir o desenvolvimento de raízes e aumentar o percentual de embriões somáticos e/ ou calos, conforme relatado para *P. peruviana* (SILVEIRA, 2018), no entanto, estariam mais suscetíveis a anormalidades morfológicas.

Tabela 3. Percentuais de eixos embrionários germinados, explantes contendo raízes, oxidação e contaminação a partir explantes obtidos de sementes maduras de *Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts, após serem submetidas a diferentes concentrações hormonais e tempos de exposição ao 2,4-D aos 60 dias após inoculação.

EXPOSIÇÃO AO 2,4-D	EIXOS EMBRIONÁRIOS GERMINADOS (%)				
	Controle	10 µM 2,4-D	20 µM 2,4-D	30 µM 2,4-D	Média
1 dia	53,33 A	30 AB	20 B	3,33 B	26,67
3 dias	53,33 A	33,33 A	23,33 AB	0 B	27,50
5 dias	53,33 A	36,66 AB	16,66 B	6,66 B	28,33
7 dias	53,33 A	30 AB	20 B	3,33 B	26,67
Média	53,33 ns	32,50 ns	20 ns	3,33 ns	27,29
EXPOSIÇÃO AO 2,4-D	EXPLANTES CONTENDO RAÍZES (%)				
	Controle	10 µM 2,4-D	20 µM 2,4-D	30 µM 2,4-D	Média
1 dia	70	73,33	56,66	66,66	66,66 ns
3 dias	70	66,66	73,33	66,66	69,16 ns
5 dias	70	70	66,66	70	69,17 ns
7 dias	70	70	73,33	73,33	71,67 ns
Média	70 ns	70 ns	67,50 ns	69,16 ns	69,17
EXPOSIÇÃO AO 2,4-D	OXIDAÇÃO (%)				
	Controle	10 µM 2,4-D	20 µM 2,4-D	30 µM 2,4-D	Média
1 dia	13,33	16,66	13,33	13,33	15 ns
3 dias	13,33	10	10	10	10,83 ns
5 dias	13,33	13,33	16,66	16,66	15 ns
7 dias	13,33	16,66	13,33	20	15,83 ns
Média	13,33 ns	14,16 ns	13,33 ns	15 ns	14,06
EXPOSIÇÃO AO 2,4-D	CONTAMINAÇÃO (%)				
	Controle	10 µM 2,4-D	20 µM 2,4-D	30 µM 2,4-D	Média
1 dia	10	6,66	10	0	6,67 ns
3 dias	10	3,33	6,66	6,66	6,66 ns
5 dias	10	6,66	10	6,66	8,33 ns
7 dias	10	3,33	0	3,33	4,17 ns
Média	10 ns	5 ns	6,67 ns	4,16 ns	6,46

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. ns: Não significativo.

Alguns espécies são mais suscetíveis à oxidação que outros. As plantas da família Myrtaceae, como a maioria das plantas lenhosas, são ricas em compostos fenólicos, e essas substâncias tornam-se um problema recorrente e responsável

por reduzir os percentuais de estabelecimento, crescimento e desenvolvimento das culturas *in vitro* (GOLLE; REINIGER, 2013; FACHINELLO et al., 2005). A oxidação, de maneira geral, não foi um fator limitante para o desenvolvimento dos cultivos de jabuticabeira, ou seja, houve o crescimento de embriões somáticos e/ ou calos mesmo em alguns explantes oxidados. O agente antioxidante polivinilpirrolidona a 1 g L⁻¹ foi relativamente eficaz, com média geral de oxidação de 14,06%. Em relação a contaminação, a média geral foi de 6,46%, resultado semelhante ao encontrado para jabuticabeira por Picolotto et al. (2007) de 2,5% a 5%, e por Silveira (2018) que variou de 3,8% (ausência de sacarose no meio de cultivo) a 18,3% (presença de sacarose).

3.5 Análises anatômicas e ultraestruturais

Microscopia óptica de luz (MO)

Em termos histológicos, os embriões somáticos e zigóticos são similares, apresentando os tecidos primários constituídos pela protoderme, meristema fundamental e procâmbio (ROCHA et al., 2016). A partir dos cortes histológicos realizados em embriões somáticos de *P. peruviana*, foi possível observar os embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 4). Os embriões somáticos possuíam anatomicamente protoderme diferenciada com células unisseriadas, justapostas e com paredes celulares delgadas (Figura 4 – B, F e H). A presença de protoderme é um indicador da formação do embrião somático, pois esse tecido é considerado o primeiro que pode ser indentificado histologicamente no processo de embriogênese, além de ser um pré-requisito para o desenvolvimento dos estádios embriogênicos posteriores (SHARMA; JALIL et al., 2008; MILLAM, 2004; QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002).

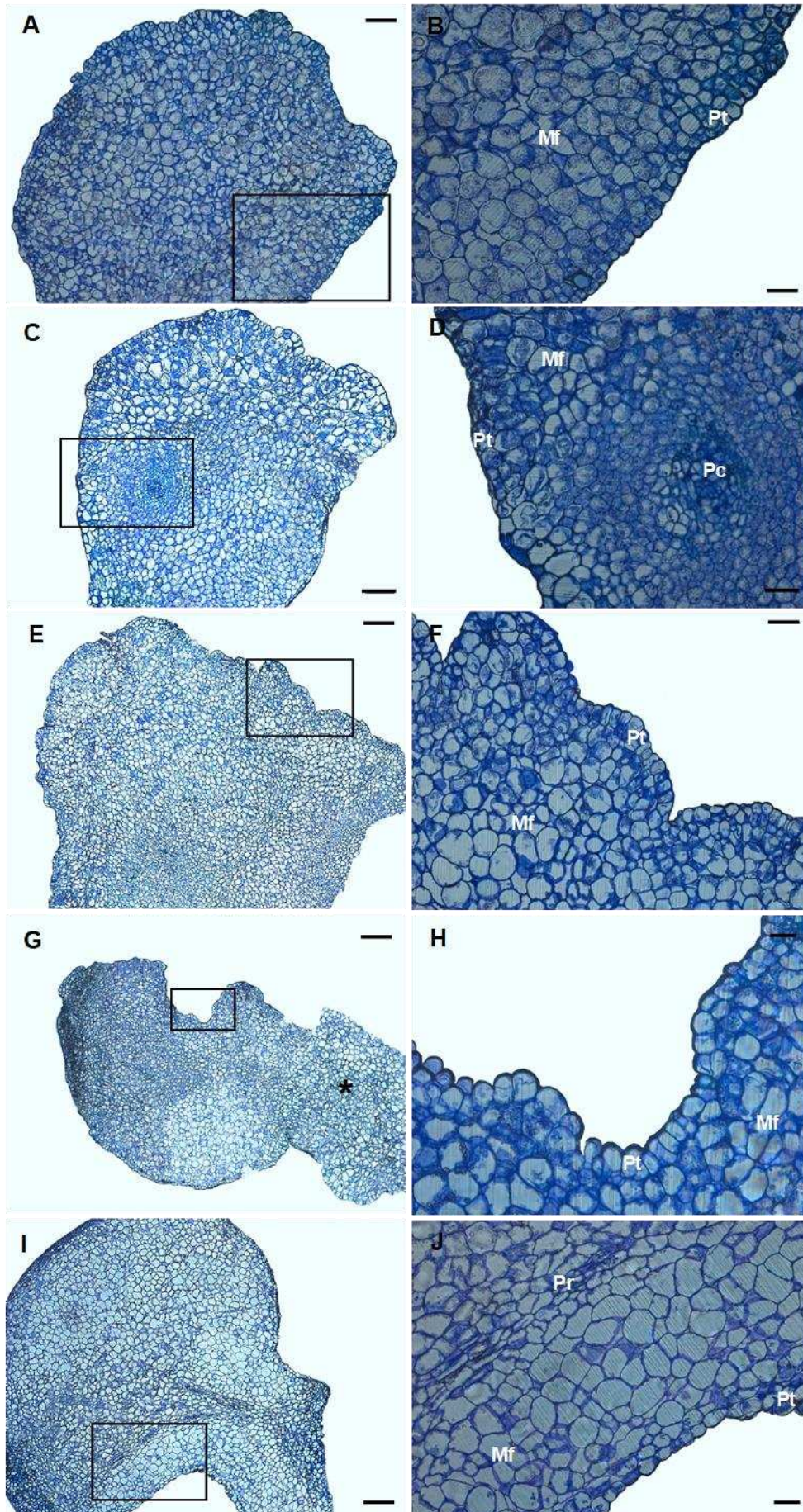


Figura 4. Aspectos anatômicos de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento a partir de explantes obtidos de sementes maduras de jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts), em meio de cultivo suplementado com 30 μM de 2,4-D. **A:** Secção anatômica de embrião somático em estágio globular. **B:** Detalhe da secção demarcada na letra **A**, que evidencia a protoderme e meristema fundamental. **C e E:** Secção anatômica de embrião somático em transição do estágio globular para cordiforme. **D:** Detalhe da secção demarcada na letra **C**, que evidencia as células procambiais. **F:** Detalhe da secção demarcada na letra **E**, que evidencia a protoderme e meristema fundamental. **G:** Secção anatômica de embrião somático em estágio cordiforme. **H:** Detalhe da secção demarcada na letra **G**, que evidencia a protoderme e meristema fundamental. **I:** Secção anatômica de embrião somático com desenvolvimento anormal. **J:** Detalhe da secção demarcada na letra **I**, que evidencia a protoderme, procâmbio e meristema fundamental. Abreviações: (**Pt**) protoderme; (**Mf**) meristema fundamental; (**Pc**) procâmbio; (**asterisco**) embrião somático sobreposto. Barras = **A e C:** 100 μm ; **B, D, F e J:** 50 μm ; **E, G e I:** 200 μm ; **H:** 20 μm .

As células do meristema fundamental tendem a ser isodiamétricas, sobretudo, foram maiores nas regiões central e distal do cotilédone em formação, que nas regiões periférica e proximal (Figura 4 - G). Foi possível observar o desenvolvimento do procâmbio com células estreitas, longitudinalmente alongadas e agrupadas em cordões (Figura 4 – C, D, I e J). As células procambiais recrutam a formação dos feixes vasculares (xilema e floema) dos diferentes órgãos e são necessárias para garantir o crescimento da planta (CAMPBELL; TURNER, 2017; HE; QU, 2016; FUKUDA, 2004). A presença de protoderme e procâmbio sugere independência do explante e sistema vascular fechado.

Além disso, observou-se em algumas amostras anormalidades correlacionadas a histodiferenciação dos embriões somáticos, com ausência ou pouco desenvolvimento de células procambiais, cotilédones anormais e não formação do meristema apical caulinar (Figura 4 – G e I). Para diminuir os impactos negativos do 2,4-D, a determinação de um tempo de permanência mínimo para a indução da ES é de grande relevância, uma vez que o 2,4-D não sofre degradação dentro das células, diferentemente de auxinas naturais como o AIA (NIC-CAN; LOYOLA-VARGAS, 2016). A manutenção das culturas por longos períodos na presença de 2,4-D pode resultar em efeitos indesejados no desenvolvimento dos embriões, apresentando anormalidades morfológicas e ausência da conversão (PESCADOR et al., 2008). Para família Myrtaceae, existem estudos que correlacionam o uso do 2,4-D com o surgimento de anormalidades morfológicas, principalmente para *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (PESCADOR et al., 2008; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2004; DAL VESCO; GUERRA et al., 2001).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Através dos estudos de MEV constatou-se o desenvolvimento de embriões somáticos de *P. peruviana* em diferentes estádios (Figura 5). A embriogênese somática ocorreu diretamente sobre os tecidos do explante e este foi o primeiro estudo a descrever uma análise ultraestrutural de embriões somáticos para essa espécie. O estágio globular é a primeira etapa de diferenciação dos embriões somáticos e representado pela formação de estruturas globulares com simetria radial (Figura 5 – A). Durante a fase de indução ou mesmo após a fase de maturação, foi possível a visualização de embriões globulares juntamente com embriões em estádios tardios, reafirmando que a embriogênese somática em jabuticabeira não ocorre de forma sincronizada, assim como em outras espécies dentro da família Myrtaceae (AKHTAR, 2010, 2013; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007; MOTOIKE et al., 2007; CANHOTO et al., 1999; CRUZ et al., 1990).

Foram identificadas os estádios globular, cordiforme e torpedo (Figura 5 – A, B e C). Na fase torpedo a simetria bilateral dos embriões somáticos ficou evidente, com acentuada diferenciação dos cotilédones e alongamento do embrião, alguns com presença do suspensor (Figura 5 – C e D). Além disso, observou-se o desenvolvimento de embriões com morfologia anormal resultante da formação de três cotilédones (Figura 5 – E e F). Segundo Cangahuala-Inocente et al. (2007) e Benelli et al. (2010), anormalidades na formação de embriões somáticos, podem estar associadas ao efeito residual do 2,4-D. Muitas culturas são dependentes do uso desse regulador de crescimento para garantir o desenvolvimento de embriões somáticos, no entanto, é necessário explorar alternativas que fujam dos protocolos convencionais de ES até agora utilizados, afim de minimizar ou eliminar os impactos negativos causados (PESCADOR et al., 2008).

Nos embriões somáticos em estádios avançados de desenvolvimento ficou evidente a presença de estômatos sobre a superfície da protoderme (Figura 5 - G), sendo possível visualizar as células-guarda, células-subsidiárias e o ostíolo (Figura 5 – H). Outros estudos relatam a presença de estômatos em embriões somáticos de *Scaevola taccada* (Gaertn.) roxb. (SHEKHAWAT et al., 2021) e embriões zigóticos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Mart. (RIBEIRO et al., 2012), a qual foi associada à grande demanda de oxigênio pelos tecidos.

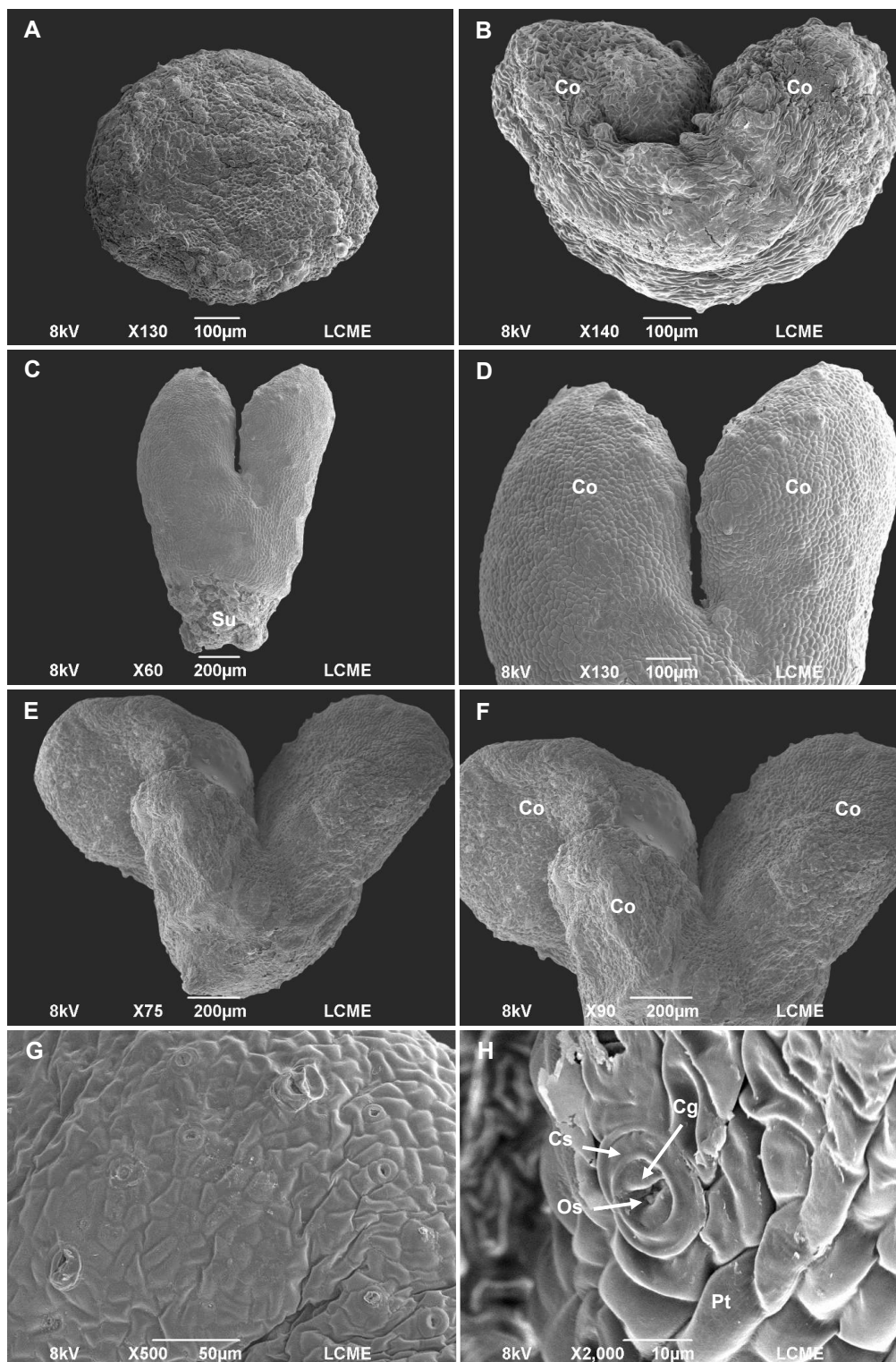


Figura 5. Aspectos ultraestruturais de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento a partir de explantes obtidos de sementes maduras de jaboticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts), em meio de cultivo suplementado com 20 µM de 2,4-D durante 5 dias de exposição. **A:** Embrião somático em estágio globular. **B:** Embrião somático em estágio cordiforme. **C:** Embrião somático em estágio torpedo. **D:** Detalhe do embrião somático apresentado na letra C evidenciando os cotilédones. **E:** Embrião somático morfologicamente anormal. **F:** Detalhe do embrião somático apresentado na letra E evidenciando múltiplos cotilédones. **G e H:** Detalhe da protoderme e estômatos em embriões somáticos. Abreviações: (**Pt**) protoderme; (**Co**) cotilédone; (**Os**) ostíolo; (**Cg**) célula guarda; (**Cs**) célula subsidiária; (**Su**) suspensor.

4 CONCLUSÃO

A formação de embriões somáticos em *P. peruviana* ocorre de maneira direta, assíncrona e com embriogênese somática repetitiva. Indica-se a concentração 20 μM de 2,4-D por 5 dias de exposição (T8) para indução da embriogênese somática com percentual de formação de 26,66%.

Através das análises morfoanatômicas e ultraestruturais os embriões somáticos foram caracterizados em diferentes estádios de desenvolvimento, e foi possível identificar anormalidades (embriões fusionados, ausência ou formação de apenas um ou múltiplos cotilédones, ausência ou pouco desenvolvimento de células procambiais, cotilédones anormais e não formação de meristema apical).

Para calogênese indica-se o uso de 20 μM de 2,4-D por 1 dia de exposição (T6) com percentual de formação de 20%. Os calos obtidos em sua maioria compactos e não apresentam potencial embriogênico, com células parenquimáticas grandes, desorganizadas e vacuolizadas.

Para as variáveis percentual de raízes, oxidação e contaminação não houve diferença significativa entre os tratamentos testados, com média geral de 69,17, 14,06 e 6,46%, respectivamente. Os maiores percentuais de eixo embrionários germinados foram no grupo controle e com o uso de 10 μM de 2,4-D, variando de 30 a 53,33% independente do período de exposição.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1679-1687. 2012.

AKHTAR, N. Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 556-562. 2010.

AKHTAR, N. Somatic embryogenesis for efficient micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) In: LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; JAIN, S. M. (Eds.) **Protocols for micropropagation of select economically-important horticultural plants**. New York: Humana Press, p. 161-177. 2013.

ALBUQUERQUE, B. R.; PINELA, J.; BARROS, L., M.; BEATRIZ, P. P.; OLIVEIRA, B. P. P.; FERREIRA, C. F. R. I. Anthocyanin-rich extract of jaboticaba epicarp as a natural colorant: Optimization of heat- and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. **Food Chemistry**, p. 316. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126364>

BAJPAI, A.; KALIM, S.; CHANDRA, R.; KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-12. 2016.

BENELLI, C.; FABBRI, A.; GRASSI, S.; LAMBARDI, M.; RUGINI, E. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 112-119. 2001.

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

CALLONI, C.; AGNOL, R. D.; MARTÍNEZ, L. S.; MARCON, F. S.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International**, v. 70, p. 15- 22. 2015.

CAMPBELL, L.; TURNER, S. Regulation of vascular cell division. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 27-43. 2017.

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

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

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

CASSOL, D. A.; WAGNER JÚNIOR, A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I. Embalagem, época e ácido indolbutírico na propagação de jaboticabeira por alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 267-272. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-2945-011/14>

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343-656. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010000200001>

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276. 2013.

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

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

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**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 530-532. 2006.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; AMBROSIO, R.; WAGNER JÚNIOR, A. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n.1, p. 246-252. 2011. DOI: [10.1590/S0100-29452011005000037](https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000037).

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

EL BAR, O. H. A.; EL DAWAYATI, M. M. Histological changes on regeneration in vitro culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 6, p. 848-855, 2014

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Eds). **Propagação de plantas frutíferas**. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, DF, p.221. 2005.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1849, n. 4, p. 385-402. 2015.

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

FUKUDA, H. Signals that control plant vascular cell differentiation. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 379-391. 2004.

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

GARCIA, C.; ALMEIDA, A. A. F.; COSTA, M.; BRITTO, D.; VALLE, R.; ROYAERT, S.; MARELLI, J. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: na overview. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 137, p. 193–212. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>

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

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

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

HE, X-Q.; QU, L.-J. Cellular and molecular features of the procambium and cambium in plant vascular tissue development. In: ROSE, R. J. (Ed.). **Molecular cell biology of 157 the growth and differentiation of plant cells**. Boca Raton: CRC Press, p. 236 - 256. 2016.

HORRIDGE, G.A.; TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science**, v. 163, p. 817- 818. 1969.

HOSSEL, C.; OLIVEIRA, J. S. M. A.; FABIANE, K. C.; WAGNER JÚNIOR, A., CITADIN, I. Conservação e teste de tetrazólio em sementes de jabuticabeira. **Rev. Bras. Frutic.** v. 35, n. 1, p.255-261. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000100029>

IBRAHIM, M. S. D.; HARTATI, R. S.; RUBIYO; PURWITO, A.; SUDARSONO. Direct and indirect somatic embryogenesis on Arabica Coffee (*Coffea arabica*). **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 2, p. 79-86. 2013.

JALIL, M.; CHEE, W. W.; OTHMAN, R. Y.; KHALID, N. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 335-340. 2008.

JAYANTHI, M.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration in oil palm. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, p. 249-251. 2011.

KOVINICH, N. et al. Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in Arabidopsis. **Planta**, v. 240, n. 5, p. 931-940. 2014.

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

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

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

NIC-CAN, G. I.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic 125 Embryogenesis: fundamental aspects and applications**. Switzerland: Springer Press, p. 171-182. 2016.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373. 1965.

PARANHOS, J. T.; LÖBLER, L.; CECHIN, J.; FERNANDES, T. S.; FAO, E.; SORIANI, H. H. PROPAGAÇÃO IN VITRO DE *Casearia sylvestris* SWARTZ (SALICACEAE). **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1191-1199. 2017. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509830301>

PAVEI, A. F.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; GUERRA, M. P. Effects of glutathione supplementation and carbon source during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O.Berg) Burret (Myrtaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 40: e40257. 2018. DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v40i1.40257

PENG, C.; GAO, F.; WANG, H.; SHEN, H.; YANG, L. Physiological and biochemical traits in korean pine somatic embryogenesis. **Forests**, v. 11, n. 5, p. 577 2020. DOI: doi:10.3390/f11050577

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

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

PETREK, J.; ZITKA, O.; ADAM, V.; BARTUSEK, K.; ANJUM, N. A.; PEREIRA, E.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Are Early Somatic Embryos of the Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) Organised? **Plos one**, v. 10, n. 12, p. 1-16. 2015.

PICOLOTTO, L., SCHUCH, M.W., SOUZA, J. A., SILVA, L. C., FERRI, J., FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento in vitro de jabuticabeira. **Scientia Agraria**. v. 8, n. 1, p. 19-23. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v8i1.8337>

PINHEIRO, M. V. M.; SCHMIDT, A. P. C.; ARAÚJO, G. M.; HOLZ, E.; OTONI, W. C.; SCHMIDT, D. Impacto da concentração de MS e qualidades de luz no alongamento e enraizamento do gengibre vermelho alpino *in vitro*. **Plant Cell Culture & Micropropagation** - ISSN 1808-9909, v. 15, n. 2, pág. 40-48. 2019. DOI: 10.46526/pccm.2019.v15i2.144

PUROHIT, S. D. Plant Cell Culture: Basic Concepts. In: PUROHIT, S. D. **Introduction to Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Delhi: PHI Learning. 2013.

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**, v. 20, p. 1141-1149. 2002.

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

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. **Trees**, v. 26, p. 851-863. 2012.

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

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

SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jabuticabeira por enxertia e alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 571-576. 2010a. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000055>

SANTOS, D. S.; OLIVEIRA, L. O.; BEISE, D. C.; MACHADO, L. O.; STEFENON, V. M. Biotechnology in *Plinia* spp. needs and perspectives for a neglected group of fruit species. **Biotecnología Vegetal**, v. 21, n. 1, p. 3 – 14. 2021.

SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jabuticabeira por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 577-583. 2010b. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000054>

SCHMIDT, É. C.; PEREIRA, B.; SANTOS, R.; PONTES, C. L. M.; SCHERNER, F.; HORTA, P. A.; PAULA, M. R.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). **Protoplasma**, v. 249, p. 353-367. 2012. DOI: 10.1007/s00709-011-0286-1

SHANG, H.-H.; LIU, C.-L.; ZHANG, C.; LI F.-L.; HONG, W.-D.; LI, F.-G. Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between *Agrobacterium* transformed embryogenic and non-embryogenic calli of cotton. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, p. 456-465. 2009.

SHARMA, S. K.; MILLAM, S. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. **Plant Cell Report**, v. 23, p. 115- 119. 2004.

SHEKHAWAT, M.S.; KANNAN, N.; MANOKARI, M.; PRIYADHARSHINI, S. Regeneration of shoots via direct somatic embryogenesis from the leaf surface of *Scaevola taccada* (Gaertn.) roxb. – a climate resilient species of coastal áreas. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 276-283. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.05.006>

SILVEIRA, S. S. **Embriogênese somática em jabuticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts): condições de cultivo in vitro e aspectos morfo-histológicos.** Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Paraná, Paraná. 2018.

SILVEIRA, S.S.; SANTOS, B. F. S.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from mature split seeds of jaboticaba (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts). **Acta scientiarum**, v. 42, n. 1: e43798. 2020. DOI: 10.4025/actasciagron.v42i1.43798

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

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

STEFENON, V. M.; PINHEIRO, M. V. M.; FREITAS, F. R.; SILVA, V. J. B.; VIEIRA, P. B.; SANTOS, D.D.; GUERRA, M. P. *In vitro* callogenesis for the induction of somatic embryogenesis and antioxidant production in *Eugenia uniflora*. **Biotecnología Vegetal**, v. 20, n. 2, p.135-146. 2020b.

STEFENON, V. M.; FREITAS, F.R.; PINHEIRO, M. V. M.; GOETEN, D.; STEINER, N.; GUERRA, M. P. . Advances and constraints in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia*, *Acca sellowiana*, and *Bactris gasipaes*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 143, p. 1928. 2020.

TALAPATRA, S.; GOSWAMI, P.; DAS, S.; RAYCHAUDHURI, S. S. Role of SERK during somatic embryogenesis and its interaction with brassinosteroids. In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, p. 141-154. 2016.

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

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159. 2013.

WAGNER JÚNIOR, A.; DANNER, M. A.; CITADIN, I. **Jaboticabeiras**. 1. ed -- Curitiba, PR: EDUTFPR, 2022. ISBN: 978-65-88596-53-1

YANG, J. L.; SEONG, E. S.; KIM, M. J.; GHIMIRE, B. K.; KANG, W. H.; YU, C. Y.; LI, C. H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 49-51. 2010.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O artigo de revisão bibliográfica pode estimular o desenvolvimento de novos estudos para o desemaranhamento genético da classificação taxonômica das espécies de *Plinia*, bem como o desenvolvimento de protocolos de propagação para o estabelecimento de cultivos comerciais visando à valorização do fruto no mercado.

Observou-se que para o estabelecimento *in vitro* de plântulas de jabuticabeira não é necessário o uso de hipoclorito de sódio para desinfestação das sementes, sendo possível a obtenção de uma satisfatória assepsia e germinação a partir do uso desinfestantes mais brandos. Foi possível obter a calogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais, discos foliares e sementes maduras divididas ao meio de *P. peruviana*. Independentemente do explante utilizado os calos não apresentaram potencial embriogênico, e para os obtidos de segmentos nodais e discos foliares foi possível avaliar aspectos organogênicos desencadeados via organogênese indireta.

Com base nos resultados de embriogênese somática, a partir de explantes obtidos de sementes maduras, é possível obter embriões somáticos primários e secundários. Para otimização de protocolos para espécie sugere-se ensaios avaliando outras concentrações de 2,4-D, além da redução do tempo de exposição à essa auxina indutora, com o uso de um tratamento pulso mínimo, de modo a garantir além da qualidade dos embriões somáticos, a redução de custos e de tempo. Outra possibilidade é através da avaliação de tratamentos de estresse com outros agentes químicos ou físicos, a exemplo o uso de uma auxina mais fraca, altas e baixas temperaturas, desidratação, salinidade e íons de metais pesados.

A não conversão dos embriões somáticos com morfologia normal pode ter sido decorrente da inadequação do sistema de cultivo (relacionado a fatores nutricionais, hormonais e/ou ambientais) durante as etapas de maturação e/ ou conversão. Dessa forma, recomenda-se a otimização desses protocolos para viabilizar o uso comercial de mudas de jabuticabeira, além da melhor compreensão dos vários eventos (morfológicos, ultraestruturais, anatômicos e moleculares) subjacentes à rota embriogênica.

As análises desenvolvidas no presente estudo podem contribuir para que novos protocolos de propagação *in vitro* sejam aprimorados em *P. peruviana*, uma espécie lenhosa nativa e altamente promissora, que apresenta muitas dificuldades relacionadas a sua propagação.

Adicionalmente, estudos relacionados a ontogênese das sementes tornam-se importantes para elucidar a origem dos embriões (poliembrião) em jabuticabeira. O encapsulamento e criopreservação dos embriões somáticos podem constituir estratégias promissoras para contornar os problemas relacionados a recalcitrância e baixa disponibilidade das sementes durante o ano. Os calos obtidos podem ser utilizados para produção em larga escala de biomassa vegetal na busca por aumentar a produção de metabólitos secundários de interesse desta espécie.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1679-1687. 2012.

AKHTAR, N. Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 556-562. 2010.

AKHTAR, N. Somatic embryogenesis for efficient micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) In: LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; JAIN, S. M. (Eds.) **Protocols for micropropagation of select economically-important horticultural plants**. New York: Humana Press, p. 161-177. 2013.

ALBUQUERQUE, B. R.; PINELA, J.; BARROS, L., M.; BEATRIZ, P. P.; OLIVEIRA, B. P. P.; FERREIRA, C. F. R. I. Anthocyanin-rich extract of jaboticaba epicarp as a natural colorant: Optimization of heat- and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. **Food Chemistry**, p. 316. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126364>

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, n. 2, p. 227-230. 2006.

ALMEIDA-TEIXEIRA, G. H.; BERLINGIERI DURIGAN, M. F.; DURIGAN, J. F. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. [Myrtaceae]). In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits**, New Dehli: Woodhead Publishing. p. 246-274. 2011.

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, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180. 2000.

ANDRADE, R. A.; MARTINS, A. B. G. Influência da temperatura na germinação de sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, p. 197-198. 2003.

ANDRADE, W. F. **Efeito do “pulse” na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado in vitro**. 55 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. 2005.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MACHADO, S. R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 429-437. 2004.

ASSIS, P. M.; DUTRA, R. C.; AMARANTE, C.; CHAVES, M. A. M.; MOREIRA, C.; BRANDÃO, M.; RAPOSO, N. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: toxicological assays, biological activities, and elemental analysis of organic compounds. **Natural Product Research**, v. 35, n. 10, p. 1727-1731. 2019.

BAJPAI, A.; KALIM, S.; CHANDRA, R.; KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-12. 2016.

BALDIN, J.C. et al. Effect of microencapsulated Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) extract on quality and storage stability of mortadella sausage. **Food Research International**, v. 108, p. 551-557. 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.03.076.

BAPTISTA, J. O.; LOPES, J. C.; SCHMILDT, E. R.; ARAUJO, C. P.; ALEXANDRE, R. S. Grafting methods and use of fasteners in monoembryonic, polyembryonic, and multi-stemmed jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell) Berg) seedlings. **Comunicata Scientiae**, v.11: e3158. 2020.

BAREKE, T. Biology of seed development and germination physiology. **Advances in Plants & Agriculture Research**. v. 8, n. 4, p. 336-346. 2018. DOI: doi:10.15406/apar.2018.08.00335

BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; COLLIN, M.; ESCOUTE, J.; LARTAUD, M.; VERDEIL, J. L.; ENGELMANN, F. Histochemical analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. **Protoplasma**, v. 251, p. 177-189. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0536-5>

BARRAL, M. T.; PARADELO, R. A review on the use of phytotoxicity as a compost quality indicator. **Dyn Soil Dyn Plant**, v. 5, p. 36-44. 2011.

BAYLY, M. J.; RIGAULT, P.; SPOKEVICIUS, A.; LADIGES, P. Y.; ADES, P. K.; ANDERSON, C.; BOSSINGER, G.; MERCHANT, A.; UDOVICIC, F.; WOODROW, I. E.; TIBBITS, J. Chloroplast genome analysis of Australian eucalypts-*Eucalyptus*, *Corymbia*, *Angophora*, *Allosyncarpia* and *Stockwellia* (Myrtaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 3, p. 704-716. 2013. DOI: 10.1016/j.ympev.2013.07.006

BENELLI, C.; FABBRI, A.; GRASSI, S.; LAMBARDI, M.; RUGINI, E. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 112-119. 2001.

BERG, O. C. Myrtaceae. *In*: Martius CPF (Ed.) **Flora Brasiliensis**, v. 14, p. 1-528. 1857.

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

CALLONI, C.; AGNOL, R. D.; MARTÍNEZ, L. S.; MARCON, F. S.; MOURA, S.; SALVADOR, M. Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). **Food Research International**, v. 70, p. 15- 22. 2015.

CAMPBELL, L.; TURNER, S. Regulation of vascular cell division. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 27-43. 2017

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

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

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

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

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

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

CARDOSO, B.P. **Reguladores de crescimento na emergência e indução de calos de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel**. MSc Thesis, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil. 2016.

CARRERA-CASTAÑO, G.; CALLEJA-CABRERA, J.; PERNAS, M.; GÓMEZ, L.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. An updated overview on the regulation of seed germination. **Plants**. v. 9, n. 6, p. 703. 2020. DOI: doi:<https://doi.org/10.3390/plants9060703>

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed., Jaboticabal: Funep, p. 588. 2012.

CASSOL, D. A.; WAGNER JÚNIOR, A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I. Embalagem, época e ácido indolbutírico na propagação de jaboticabeira por

alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 267-272. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-2945-011/14>

CASSOL, D. A.; PIROLA, K.; DOTTO, M.; CITADIN, I.; MAZARO, S. M.; WAGNER JÚNIOR, A. Grafting technique and rootstock species for the propagation of *Plinia cauliflora*. **Ciência Rural**, v. 47, n. 02, e20140452. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140452>

CEAGESP. **Jaboticaba**. 2017. Acesso em agosto de 2020. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/guia-ceagesp/jaboticaba/>

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343-656. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010000200001>

CRUZ, E. S.; DANTAS, A. C. V. L.; CARMO, C. D.; BASTOS, L. P. Molecular characterization of jaboticaba tree genotypes located in the municipalities of Recôncavo of Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 3: e-510. 2016. DOI: 10.1590/0100-29452016510

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, n.3, p.271-276. 2013. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>

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

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

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**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 530-532. 2006. DOI: 10.1590/S0100-29452006000300043

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**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 530-532. 2006.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JUNIOR, A. A.; ASSMANN, A. P.; DANNER, M.A., CITADIN, I., SASSO, S.A.Z., AMBROSIO, R., WAGNER JÚNIOR, A. Armazenamento a vácuo prolonga a viabilidade de sementes de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1, p. 246-252. 2011. DOI: 10.1590/S0100-29452011005000037

DI MAIO, C.; PITTIA, P.; MAZZARINO, L.; MARASCHIN, M.; KUHNEN, S. Cow milk enriched with nanoencapsulated phenolic extract of jaboticaba (*Plinia peruviana*). **J Food Science and Technology**, v. 56, n. 3. p.1165-1173. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03579-y>

DIAS, M. A.; LOPES, J. C.; SOUZA NETO, J. D.; HEBERLE, H. Influência da temperatura e substrato na germinação de sementes de jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). **Idesia (Chile)**, v. 29, n.1, p. 23-27. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292011000100004>

DIBAX, R.; QUISEN, R. C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant Regeneration from Cotyledonary Explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and Histological Study of Organogenesis *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 311-318. 2010.

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

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

EGUILUZ, M.; YUYAMA, P. M.; GUZMAN, F.; RODRIGUES, N. F.; MARGIS, R. Complete sequence and comparative analysis of the chloroplast genome of *Plinia trunciflora*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 4, p. 871–876. 2017. DOI: [10.1590/1678-4685-gmb-2017-0096](https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0096)

EL BAR, O. H. A.; EL DAWAYATI, M. M. Histological changes on regeneration *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 6, p. 848-855, 2014.

ELHITI, M.; STASOLLA, C. Somatic embryogenesis: the molecular network regulating embryo formation. In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, p. 217-229. 2016.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Contaminação *versus* manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia**, 71:e00562018. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071072>

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Eds). **Propagação de plantas frutíferas**. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, DF, 2. Ed., p. 221, ISBN: 8573833009. 2005.

FEHÉR, A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 536. 2019. DOI: [doi:10.3389/fpls.2019.00536](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536)

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1849, n. 4, p. 385-402. 2015.

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

FERRARI, I. F.; MARQUES, G. A.; JUNIOR, W. L. S.; BIAZOTTI, B. B.; PENA PASSOS, M.; DE ALMEIDA, J. A. S.; MONDEGO, J. M. C.; MAYER, J. L. S. Comparative ontogenesis of *Coffea arabica* L. somatic embryos reveals the efficiency of regeneration modulated by the explant source and the embryogenesis pathway. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. v. 57, n. 5, p. 796-810. 2021. DOI: doi:10.1007/s11627-021-10200-

FETT-NETO, A.G. et al. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globules*. **Tree physiology**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 457-464. 2001.

FIDELIS, M. et al. Polyphenols of jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O.Berg] seeds incorporated in a yogurt model exert antioxidant activity and modulate gut microbiota of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Food Chemistry**, p. 334. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127565>

FIDELIS, M. et al. Response surface optimization of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] O.Berg) seeds: Antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic, antihypertensive and cytotoxic assessments. **Food and Chemical Toxicology**, p.142. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111et 9>

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

FRANCO, L. R. L., SILVA, J. F., MAIA, V. M., LOPES, P.S., AMORIM, I. J. F., MIZOBUTSI, E. H. Pegamento e crescimento inicial de mudas de jaboticabeiras 'açú' e 'sabará' submetidas a dois tipos de enxertia. **Revista Ceres**, v. 57, n. 4, p. 535-538. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2010000400016>

FUKUDA, H. Signals that control plant vascular cell differentiation. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 379-391. 2004.

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

GARCIA, C.; ALMEIDA, A. A. F.; COSTA, M.; BRITTO, D.; VALLE, R.; ROYAERT, S.; MARELLI, J. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 193–212. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>

GASPAROTTO JUNIOR, A.; SOUZA, P.; LÍVERO, F. A. R. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: A comprehensive ethnopharmacological review of a genuinely Brazilian species. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 245. 2019.

GENEROSO, A. L.; VIANA, A. P.; CARVALHO, V. S.; JÚNIOR, C. *In vitro* germination to overcome dormancy in seeds of 'Red Globe', 'Italia' and 'Niagara Rosada' grapes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 5, p. 1-6. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452019495>

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

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, S. M.; SERROTE, C. M. L. Fitorreguladores na calogênese e rizogênese em *Eugenia involucrata*. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 40, e201901908, p. 1-9. 2020a. DOI: <http://doi.org/10.4336/2020.pfb.40e201901908>

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, S. M.; SERROTE, C. M. L.; RABAIOLLI, S. M. S.; SILVA, K. B. Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 898-906. 2020b.

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

GOVAERTS, R. et al. **World Checklist of Myrtaceae**. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, p. 1-455, ISBN: 1842463918. 2008.

GOVAERTS, R. et al. **World checklist of Myrtaceae**. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 455. 2019. Disponível em: <http://wcsp.science.kew.org/> Retrieved.

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

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

GUPTA, N.; JAIN, V. JOSEPEH, M.R.; DEVI, S. A Review on Micropropagation Culture Method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, India, v. 8, n. 1, p. 86-93. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653>

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

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Propagation: principles and practices**. Publishing company Prentice Hall, 8. ed. New Jersey. 2011.

HE, X-Q.; QU, L.-J. Cellular and molecular features of the procambium and cambium in plant vascular tissue development. In: ROSE, R. J. (Ed.). **Molecular cell biology of 157 the growth and differentiation of plant cells**. Boca Raton: CRC Press, p. 236 - 256. 2016.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen. p. 15-53. 2000.

HORRIDGE, G. A.; TAMM, S. L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science**, v. 163, p. 817- 818. 1969.

HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Wiley Regeneration**, v. 4, n. 4, p. 201-216. 2017.

HOSSEL, C.; OLIVEIRA, J. S. M. A.; FABIANE, K. C.; WAGNER JÚNIOR, A.; CITADIN, I. Conservação e teste de tetrazólio em sementes de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n.1, p. 255-261. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000100029>

HOSSEL, C.; WAGNER JÚNIOR, A.; HOSSEL, J. S. A. O.; FABIANE, K. C.; DALLAGO, A. Rooting of jabuticabeira of cabinho mini-cuttings (*Plinia trunciflora*). **Comunicata Scientiae**, v.9, n. 4, p. 613-620. 2018. DOI: 10.14295/CS.v9i4.2737

HU, Z. et al. Callus production, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum* root explans. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 52, n. 1, p. 93-96. 2008.

IBRAHIM, M. S. D.; HARTATI, R. S.; RUBIYO; PURWITO, A.; SUDARSONO. Direct and indirect somatic embryogenesis on Arabica Coffee (*Coffea arabica*). **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 2, p. 79-86. 2013.

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe*

edulis) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n. 1, p. 422-433. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>

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

JALIL, M.; CHEE, W. W.; OTHMAN, R. Y.; KHALID, N. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 335-340. 2008.

JAYANTHI, M.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration in oil palm. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, p. 249-251. 2011.

KAUSEL, V. E. Beitrag zur Systematik der Myrtaceen. In: KAUSEL, VE. **Arkiv för Botanik**, p. 491-516. Almqvist & Wikssels Boktryckeri Ab, 3. ed., Estocolmo. 1956.

KOVINICH, N. et al. Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 240, n. 5, p. 931-940. 2014.

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

LANDA, F.S.L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 24, 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.

LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: CID, L.P.B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa-CNPQ. 4. ed., p. 70. 2015.

LIMA, A. P. P. S.; BASTOS, F. J. O.; LIMABRITO, A.; FERNANDES, G. B.; SANTANA, J. R. F. Modulação do meio de cultura na conservação *ex situ* de *Neoregelia mucugensis* Leme (Bromeliaceae). **Revista Caatinga**, v. 34, n. 4. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252021v34n403rc>

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 2, 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 3, 1 ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2011.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2006.

MACHADO, L. O.; VIEIRA, L. N.; STEFENON, V. M.; FAORO, H.; PEDROSA, F. O.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Molecular relationships of *Campomanesia xanthocarpa* within Myrtaceae based on the complete plastome sequence and on the plastid *ycf2* gene. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 2: e20180377. 2020. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2018-0377

MACHADO, L. O.; VIEIRA, L. N.; STEFENON, V. M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; GUERRA, M.P.; NODARI, R. O. Phylogenomic relationship of feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) with other Myrtaceae based on complete chloroplast genome sequences. **Genetica**, v. 145, n. 2, p. 163–174. 2017. DOI: 10.1007/s10709-017-9954-1

MAHDAVI-DARVARI, F.; NOOR, N. M.; ISMANIZAN, I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 2, p. 407-422. 2014.

MALAGI, G.; CITADIN, I.; SCARIOTTO, S.; WAGNER JÚNIOR, A.; SACHET, M. R. Enxertia interespecífica de jabuticabeira: influência do tipo de garfo. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 221-224. 2012. DOI: 10.1590/S0103-84782012005000006

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 2: técnicas de produção e mercado: feijoa, figo-da-índia, fruta-pão, jaca, lichia, mangaba**. Editora Cinco Continentes. Porto Alegre, RS. p. 241. 2002.

MANNINO, G.; PERRONE, A.; CAMPOBENEDETTO, C.; SCHITTONI, A.; MARGHERITA BERTEA, C.; GENTILE, C. Phytochemical profile and antioxidative properties of *Plinia trunciflora* fruits: A new source of nutraceuticals. **Food Chemistry**, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125515

MATTOS, J.R. **Novidades Taxonômicas em Myrtaceae**. Loefgrenia: Comunicações Avulsas de Botânica v. 112, n. 5, Florianópolis. 1998.

MELO, A. T. O.; COELHO, A. S. G.; PEREIRA, M. F.; BLANCO, A. J. V.; FRANCESCHINELLI, E. V. Genética da conservação de *Cabralea canjerana* (vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de mata atlântica na APA Fernão Dias. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 365-374. 2015. DOI: 10.1590/0100-67622015000200016

MENDEZ-HERNANDEZ, H.A.; LEDEZMA-RODRIGUEZ, M.; AVILEZ-MONTALVO, R.N.; JUAREZ-GOMEZ, Y.L.; SKEETE, A.; AVILEZ-MONTALVO, J.; DE-LA-PENA, C.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 77, 2019. DOI: doi:10.3389/fpls.2019.00077

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul.** Brasília. 2011.

MONTEIRO, A. C. B. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora*.** Piracicaba, p. 82, Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2000.

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

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

NAKAGAWA, J. Testes de Vigor Baseados no Desempenho das Plântulas In. KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes.** Abrates (Londrina), p. 2.1-2.24. 1999.

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

NEUMANN, K. H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture – a toll in biotechnology: basics and application.** Berlin: Springer Verlag, p. 333. 2009.

NIC-CAN, G. I.; LOYOLA-VARGAS, V. M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Somatic 125 Embryogenesis: fundamental aspects and applications.** Switzerland: Springer Press, p. 171-182. 2016.

NOGUEIRA, R. C. **Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).** Dissertação (Agronomia/Fisiologia vegetal). Universidade Federal de Lavras, p. 50. 2006.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 48-50. 2007.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373. 1965.

OLIVEIRA, F. L. R.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; FRAGA, H. P. F.; DEGENHARDT, J.; QUOIRIN, M. Embryogenic cultures and somatic embryos

development from mature seeds of jaboticaba (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel). **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, v. 94, n. 4. 2022. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220201073>

OLIVEIRA, F. L. R. **Embriogênese somática em jaboticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel)**. MSc Thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. 2018.

OLIVEIRA, G. P.; ANGELOTTI-MENDONÇA, J.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, S. R.; SCARPARE FILHO, J. A. Origin and development of reproductive buds in jaboticaba cv. Sabará (*Plinia jaboticaba* Vell). **Scientia Horticulturae**, v. 249, p. 432-438. 2019. DOI:10.1016/j.scienta.2019.02.020

PALOZI, R. A. C. et al. Pharmacological safety of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel in rabbits. **Toxicology Reports**, v.6, p. 616-624. 2019. DOI: 10.1016/j.toxrep.2019.06.017

PALÚ, E. G.; CORRÊA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Use of antibiotics for the control of endogenous bacteria aiming at the micropropagation of the fig tree. **Brazilian Journal of Fruticulture**, v. 33, n. 2, p. 587- 592. 2011.

PARANHOS, J. T.; LÖBLER, L.; CECHIN, J., FERNANDES, T. S., FAO, E.; SORIANI, H. H. PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Casearia sylvestris* SWARTZ (SALICACEAE). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 4, p. 1191-1199. 2017 . DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509830301>

PAVEI, A. F.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; GUERRA, M. P. Effects of glutathione supplementation and carbon source during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O.Berg) Burret (Myrtaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences** v. 40: e40257. 2018. DOI: 10.4025/actascibiolsci.v40i1.40257

PAZ, L. et al. Phytotoxic Effects of African Mahogany Seedlings to Herbicides. **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 4. 2018.

PENG, C.; GAO, F.; WANG, H.; SHEN, H.; YANG, L. Physiological and biochemical traits in korean pine somatic embryogenesis. **Forests**, v. 11, n. 5, p. 577 2020. DOI: doi:10.3390/f11050577

PEREIRA, M.; OLIVEIRA, A. L.; PEREIRA, R. E. A.; SENA, J. A. D.; COSTA, J. R. V.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Morphologic and molecular characterization of *Myrciaria* spp species. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 507-510. 2005. DOI: 10.1590/S0100-29452005000300040

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

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

PETREK, J.; ZITKA, O.; ADAM, V.; BARTUSEK, K.; ANJUM, N. A.; PEREIRA, E.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Are Early Somatic Embryos of the Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) Organised? **Plos one**, v. 10, n. 12, p. 1-16. 2015.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J., FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jaboticabeira. **Sciencia Agraria**, v. 8, n.1, p. 19-23. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rso.v8i1.8337>

PINHEIRO, M. V. M.; SCHMIDT, A. P. C.; ARAÚJO, G. M.; HOLZ, E.; OTONI, W. C.; SCHMIDT, D. Impacto da concentração de MS e qualidades de luz no alongamento e enraizamento do gengibre vermelho alpino *in vitro*. **Plant Cell Culture & Micropropagation - ISSN 1808-9909**, v. 15, n. 2, pág. 40-48. 2019. DOI: 10.46526/pccm.2019.v15i2.144.

PITZ, H. S.; PEREIRA, A.; VOYTENA, A. P. L.; TREVISAN, A. C. D.; AFFONSO, R. C. L.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARASCHIN, M. Cytoprotective Effects of Jaboticaba (*Plinia peruviana*, Poir. Govaerts) Fruit Peel Extracts against H₂O₂-Induced Oxidative Stress. **Reactive Oxygen Species**, v. 4, n. 11, p. 362–371. 2017. DOI: 10.20455/ros.2017.859

PUROHIT, S. D. Plant Cell Culture: Basic Concepts. In: PUROHIT, S. D. **Introduction to Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Delhi: PHI Learning. 2013.

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**, v. 20, p. 1141-1149. 2002.

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

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

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. **Trees**, v. 26, p. 851-863. 2012.

ROCHA, D. I.; KURCZYNSKA, E.; POTOCKA, I.; STEINMACHER, D. A.; OTONI, W. C. Histology and histochemistry of somatic embryogenesis. In: LOYOLA-

VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEIO, N. (Eds.). **Somatic Embryogenesis: fundamental aspects and applications**. Springer Press, p. 471-494. 2016.

RODRIGUES, M. A. V. et al. Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jaboticaba peel: Rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 769–779. 2020.

ROMÃO, P. V. M.; PALOZI, R.; GUARNIER, L. P.; SILVA, A. O.; LORENÇONE, B. R.; NOCCHI, S. R.; MOURA, C.; LOURENÇO, E.; SILVA, D. B.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Cardioprotective effects of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel in a rabbit model of doxorubicin-induced heart failure. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 242. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112042>

ROSSA, Ü. B.; TRICHES, G. P.; GROSSI, F.; NOGUEIRA, A. C.; REISSMANN, C. B.; RAMOS, M. R. Germinação de sementes e qualidade de mudas de *Plinia trunciflora* (jaboticabeira) em função de diferentes tratamentos pré germinativos. **Floresta**, v. 40, n. 2, p. 371-378. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/ufv.v40i2.17832>

ROY, A.T.; KOUTOULIS, A.; DE, D.N. Cell suspension culture and plant regeneration in the latex-producing plant, *Calotropis gigantean* (Linn.) R. Br. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 15-22. 2000.

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

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, v. 44, p. 2072–2075. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.002>

SALLA, V. P. **Diversidade e estrutura genética populacional em jaboticabais nativos no sudoeste do Paraná**. Tese de doutorado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Brazil. 2019.

SALLA, V. P. **Apomixia determinando a estrutura genética de uma população de *Plinia cauliflora* no sudoeste do paraná**. Dissertação de mestrado, Pato Branco. 2016.

SANTOS, B. R. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p.510-514. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000300004>

SANTOS, D. S.; OLIVEIRA, L. O.; BEISE, D. C.; MACHADO, L. O.; STEFENON, V. M. Biotechnology in *Plinia* spp. needs and perspectives for a neglected group of fruit species. **Biotecnología Vegetal**, v. 21, n. 1, p. 3 – 14. 2021.

SANTOS, S. K.; LUNA, N. P.; DA COSTA JÚNIOR, O.; DIAS, M.; GOMES, D.; FONSECA, K. Germination *in vitro* of Jaboticabeira *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 35, n. 6, p.1-8. 2019. DOI: <https://doi.org/10.9734/jeai/2019/v35i630221>

SARTOR, F. R.; MÜLLER, N. T. G.; MORAES, A. M. Efeito do ácido indolbutírico e de substratos na propagação de estacas e sementes de jaboticabeira. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 4, n. 3, p. 11-15. 2010.

SASSO, S. A. Z. **Propagação vegetativa de jaboticabeira**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), p. 64, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco – RS. 2009.

SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jaboticabeira por enxertia e alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 571-576. 2010a. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000055>

SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; DANNER, M. A. Propagação de jaboticabeira por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n.2, p. 577-583. 2010b. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000054>

SCHMIDT, É. C.; PEREIRA, B.; SANTOS, R.; PONTES, C. L. M.; SCHERNER, F.; HORTA, P. A.; PAULA, M. R.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). **Protoplasma**, v. 249, p. 353-367. 2012. DOI: 10.1007/s00709-011-0286-1

SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; SIDDIQUI, S. A. Somatic Embryogenesis: A Valuable Strategy for Phyto-Climbing Diversity Conservation. In: SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; SHANG, H.; LIU, C.; ZHANG, C.; LI, F.; HONG, W.; LI, F. Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between 55 Agrobacterium transformed embryogenic and non-embryogenic calli of cotton. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, n. 5, p. 456-465. 2009.

SHARMA, S. K.; MILLAM, S. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. **Plant Cell Report**, v. 23, p. 115- 119. 2004.

SHEKHAWAT, M.S.; KANNAN, N.; MANOKARI, M.; PRIYADHARSHINI, S. Regeneration of shoots via direct somatic embryogenesis from the leaf surface of *Scaevola taccada* (Gaertn.) roxb. – a climate resilient species of coastal áreas. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 276-283. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.05.006>

SIDDIQUI, S. A. (Eds.). **Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers**. New York: Springer, p. 195-216. 2016.

SILVA, J. A. A.; TEIXEIRA, G. H. A.; MARTINS, A. B. G.; CITADIN, I.; WAGNER, J. A.; DANNER, M. A. Advances in the propagation of Jaboticaba tree. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 3: e-024. 2018. DOI: 10.1590/0100-29452019024

SILVA, C. P.; LACERDA, E. G.; SANCHES, L. F. J.; QUEIROZ, J. O.; MARCHIOTTI, R. C. B. Enraizamento de estacas de Jaboticabeira tratadas com ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA). **Revista Agrária Acadêmica**, v. 2, n. 3, p. 122-132. 2019. DOI: 10.32406/v2n32019/122-132/agrariacad

SILVEIRA, S. S. **Embriogênese somática em jaboticabeira (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts): condições de cultivo in vitro e aspectos morfo-histológicos**. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Paraná, Paraná. 2018.

SILVEIRA, S. S.; SANTOS, B. F. S.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from mature split seeds of jaboticaba (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts). **Acta scientiarum**, v. 42, n. 1, e43798. 2020. DOI: 10.4025/actasciagron.v42i1.43798

SILVEIRA, V.; VITA, A. M.; MACEDO, A. F.; DIAS, M. F. R.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 114, n. 3, p. 351-64. 2013.

SOBRAL, M. Adoxaceae. In: **Lista de espécies do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB004253>

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

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

SORIN, C. et al. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require argonaute1w. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 17, n. 5, p. 1343 – 1359. 2005.

SOUZA FERREIRA, D. N. DE; CAMARGO, J. L. C.; FERRAZ, I. D. K. Do polyembryonic seeds of *Carapa surinamensis* (Meliaceae) have advantages for seedling development? **Acta Amazonica**, v. 49, p. 97-104. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201801211>

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. 2. Ed, Instituto Plantarum: Nova Odessa. 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SEVERI, J. A.; RODRIGUES, E. R.; PAULA, M. I.; FREITAS, J. A.; VILEGAS, W.; PIETRO, R. C. L. R. Flavonóides de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) com atividade antifúngica. **Natural Product Research**, v. 33, n.17, p. 2579-2582. 2019. DOI: 10.1080 / 14786419.2018.1460827

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

STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Embriogênese somática de tecidos florais de feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 117–126. 2005.

STEFENON, V. M. **Micropropagation: Methods and Effects**. Ed. Nova Science Publishers, Inc. New York. 2019.

STEFENON, V. M.; PINHEIRO, M. V. M.; FREITAS, F. R.; SILVA, V. J. B.; VIEIRA, P. B.; SANTOS, D. D.; GUERRA, M. P. *In vitro* callogenesis for the induction of somatic embryogenesis and antioxidant production in *Eugenia uniflora*. **Bioteχνologia Vegetal**, v. 20, n. 2, p.135-146. 2020.

STEFENON, V. M.; FREITAS, F. R.; PINHEIRO, M. V. M.; GOETEN, D.; STEINER, N.; GUERRA, M. P. Advances and constraints in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia*, *Acca sellowiana*, and *Bactris gasipaes*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 143, p. 1928. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01928-w>

SU, Y. H.; TANG, L. P.; ZHAO, X. Y.; AND ZHANG, X. S. Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, p. 228–240. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jipb.12972>

TAIZ, L.; ZAYGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.119. 2004.

TALAPATRA, S.; GOSWAMI, P.; DAS, S.; RAYCHAUDHURI, S. S. Role of SERK during somatic embryogenesis and its interaction with brassinosteroids. In: MUJIB, A. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, p. 141-154. 2016.

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

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, p. 182. 2005.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, v.1, p. 184-185. 1998.

VIEIRA, M. L. C.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. e VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 911-938. 2001.

VIEIRA, R. A. et al. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades rb867515 e rb855156 de cana-de açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 122-126. 2009.

VIEITES, R. L.; DAIUTO, E. R.; MORAES, M. R.; NEVES, L. C.; CARVALHO, L. R. Caracterização físico-química, bioquímica e funcional da jaboticaba armazenada sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 362-375. 2011.

VILELA, R. C. F.; ASSIS, J. G. A.; FILHO, L. N.; VIANA, B. F. Sistema reprodutivo e diversidade genética de quatro espécies de *Myrciaria* (Myrtaceae, jaboticabeiras). **Acta Botânica Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 727-734. 2012. DOI: 10.1590/S0102-33062012000400002

VILELA, M. S. P.; ANDRADE, J. C.; SANTOS, R. S.; STEIN, V.C.; PAIVA, L. V. Histological analysis of indirect somatic embryogenesis induced from root explants of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 43, n. 1. 2019.

WAGNER JÚNIOR, A.; FRANZON, R. C.; SILVA, J. O. C.; SANTOS, C. E. M.; GONÇALVES, R. S.; BRUCKNER, C. H. Effect of temperature on germination of seeds of three species of jaboticabeira. **Ceres Journal**, v. 54, n. 314, p. 345-350. 2006b.

WAGNER JÚNIOR, A.; SILVA, J. O. C.; PIMENTEL, L. D.; NEGREIROS, J. R. S.; ALEXANDRE, R. S.; MORGADO, M. A. D.; ÁLVARES, V. S.; BRUCKNER, C. H. Germinação e emergência de três espécies de jaboticabeira em quatro substratos. **Revista Ceres**, v.53, n. 307, p. 322-327. 2006a.

WAGNER JÚNIOR, A.; SILVA, J. O. C.; PIMENTEL, L. D.; SANTOS, C. E. M.; BRUCKNER, C. H. Germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de jaboticabeira em função do tamanho de sementes. **Acta Scientiarum**, v. 33, n. 1, p. 105-109. 2011. DOI: 10.4025/actasciagron.v33i1.4881

WAGNER JÚNIOR, A.; DANNER, M. A.; CITADIN, I. **Jaboticabeiras**. 1. ed -- Curitiba, PR: EDUTFPR, 2022. ISBN: 978-65-88596-53-1

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

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159. 2013.

YANG, J. L.; SEONG, E. S.; KIM, M. J.; GHIMIRE, B. K.; KANG, W. H.; YU, C. Y.; LI, C. H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) root explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 49-51. 2010.

YIL, J. Y.; SYLVESTRE, I.; COLIN, M.; SALMA, M.; LEE, S. Y.; KIM, H. H.; ... & ENGELMANN, F. Improved cryopreservation using droplet-vitrification and histological changes associated with cryopreservation of Madder (*Rubia akane* Nakai). Korean **Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 30, n. 1, p.79-84. 2012.

ZHAO, D.J. et al. Jaboticabin and Related Polyphenols from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) with Anti-inflammatory Activity for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 67, n. 5, p. 1513-1520. 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b05814