



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

AÇÃO DE ANTIBIÓTICO NA GERMINAÇÃO E MICROENXERTIA *IN VITRO*
DE *Myrciaria jaboticaba* (VELL.) BERG

SABRINA KELLY DOS SANTOS

AREIA – PB
JULHO – 2017

SABRINA KELLY DOS SANTOS

**AÇÃO DE ANTIBIÓTICO NA GERMINAÇÃO E MICROENXERTIA *IN VITRO*
DE *Myrciaria jaboticaba* (VELL.) BERG**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade Federal da
Paraíba, Centro de Ciências Agrárias,
Campus II – Areia – PB, como parte
integrante dos requisitos para obtenção do
título de **Engenheira Agrônoma**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Núbia Pereira da Costa Luna

AREIA – PB
JULHO – 2017

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

S237a Santos, Sabrina Kelly dos.

Ação de antibiótico na germinação e microenxertia *in vitro* de *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg / Sabrina Kelly dos Santos. - Areia: UFPB/CCA, 2017.
x, 52 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

Bibliografia.

Orientadora: Núbia Pereira da Costa Luna.

1. Jaboticabeira – Propagação 2. *Myrciaria jaboticaba* – Sementes 3.
Jaboticaba – Germinação I. Luna, Núbia Pereira da Costa (Orientadora) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 582.776.2

SABRINA KELLY DOS SANTOS

ACÇÃO DE ANTIBIÓTICO NA GERMINAÇÃO E MICROENXERTIA *IN VITRO*
DE *Myrciaria jaboticaba* (VELL.) BERG

Apresentado e Aprovado em: 24 de julho de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Núbia Pereira da Costa Luna

Profª. Drª. Núbia Pereira da Costa Luna (CCA/UFPB)
(ORIENTADORA)

Lucinalva Azevedo dos Santos

Ma. Lucinalva Azevedo dos Santos (CCA/UFPB)
(EXAMINADORA)

Robério de Oliveira

Dr. Robério de Oliveira (CCA/UFPB)
(EXAMINADOR)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao senhor meu Deus, a Nossa Senhora de Aparecida,
e a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, saúde, sabedoria, inteligência e humildade.

À minha avó, Antonia Maria dos Santos, que esteve sempre me apoiando.

À minha mãe Sonia Maria dos Santos, meu Tio Severino quem muitas vezes me socorreu quando não havia transporte disponível, minhas tias Josefa Maria e Maria das Dores.

A meu noivo Daniel Gomes, quem tanto amo, por todo apoio, força, paciência, amor e carinho.

À Professora Núbia Pereira da Costa Luna pela orientação, ajuda, paciência e apoio.

Ao Professor Walter Esfrain Pereira pela ajuda na estatística e a Professora Naysa Flávia Ferreira do Nascimento pelos conhecimentos transmitidos.

Aos que fazem parte do LABCULTIVE, Otacílio por toda ajuda nos experimentos, Cosmo (técnico do laboratório), Francisco Jeanes, Luan Pereira, Karollayne, Lucinalva, Andressa, Sabrina Pereira, Jailma, Anderson e Carlos.

Às minhas amigas de infância Maria Aline, Aline Mayara e Giverlane.

À minha comadre Luana, a minha princesa-afilhada Layse Vitória, e as minhas amigas Ivamberta e Amandha.

Aos meus amigos de turma por todos os momentos de descontração, Fernanda, Priscylla, Harly, José Edson, Diego, Expedito, Vanda Maria, Galileu, Gabriel, Érico, Hiago, Geyse, Adeildo, Joaquim, Valdeir, Lucas, David, Fabiano, Luan Cardoso, Ian e Josevan.

Enfim, agradeço a todos que se fizeram e farão presentes em minha vida, o meu sincero obrigado a todos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. A Jabuticabeira (<i>Myrciaria jaboticaba</i>)	3
2.2. A Micropropagação de Plantas	5
2.3. Meios de Cultura.....	7
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO 1: GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE JABUTICABEIRA <i>Myrciaria jaboticaba</i> (VELL.) BERG	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1. Preparação das Sementes de <i>Myrciaria jaboticaba</i>	21
2.2. Preparação dos Meios de Cultura	22
2.3. Tratamentos	22
2.3.1. Tratamento 1 – Germinação <i>in vitro</i> de sementes de jaboticaba embebidas por 24 horas e inoculadas em meio de cultura líquido.....	22
2.3.2. Tratamento 2 – Germinação <i>in vitro</i> de sementes de jaboticaba embebidas por 24 horas e inoculadas em meio de cultura semi-sólido.....	23
2.3.3. Tratamento 3 – Germinação <i>in vitro</i> de sementes de jaboticaba utilizando antibiótico na embebição por 24 horas e inoculadas em meio de cultura líquido.....	23

2.3.4.	Tratamento 4 – Germinação <i>in vitro</i> de sementes de jabuticaba utilizando antibiótico na embebição por 24 horas e inoculadas em meio de cultura semi-sólido	23
2.3.5.	Tratamento 5 – Germinação <i>in vitro</i> de sementes de jabuticaba embebidas por 24 horas e inoculadas no meio de cultura líquido contendo antibiótico	24
2.3.6.	Tratamento 6 - Germinação <i>in vitro</i> de sementes de jabuticaba embebidas por 24 horas e inoculadas no meio de cultura semi-sólido contendo antibiótico	24
2.4.	Delineamento Experimental e Avaliações	24
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.	CONCLUSÕES	33
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
	CAPÍTULO 2: MICROENXERTIA <i>IN VITRO</i> DE JABUTICABEIRA <i>Myrciaria jaboticaba</i> (VELL.) BERG	38
	RESUMO.....	39
	ABSTRACT	40
1.	INTRODUÇÃO	41
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1.	Obtenção dos Microenxertos	43
2.2.	Tratamentos	43
2.2.1.	Tratamento 1 – Estacas de uma planta matriz diretamente do campo.....	43
2.2.2.	Tratamento 2 – Estacas de planta do campo tratadas com antibiótico	44
2.2.3.	Tratamento 3 – Estacas de plantas cultivadas <i>in vitro</i>	44
2.3.	Processo de Microenxertia.....	45
2.4.	Delineamento Experimental	45
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.	CONCLUSÕES	50
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Preparação das sementes. Fruto após lavagem (A); Sementes com polpa recém retiradas do fruto (B); Sementes com tegumento após secagem à sombra (C); Sementes sem o tegumento (D). Areia – PB. 2017.....22
- Figura 2.** Curva de germinação dos seis tratamentos. L – meio líquido; SS – meio semi-sólido; S.A.: sem utilização do antibiótico; E.S.A.: embebição de sementes no antibiótico; A.M.: antibiótico no meio. Areia – PB, 2017.....27
- Figura 3.** Plântulas de *Myrciaria jaboticaba* obtidas no cultivo *in vitro*. Meio líquido sem antibiótico (A); Meio semi-sólido sem antibiótico (B); Meio líquido, sementes embebidas no antibiótico (C); Meio semi-sólido, sementes embebida no antibiótico (D); Meio líquido com antibiótico no meio (E); Meio semi-sólido, com antibiótico no meio (F). Areia – PB, 2017.....32
- Figura 4.** Esquema do corte das estacas da planta do campo e das folhas. Areia – PB, 2017.....44
- Figura 5.** Sequência do processo da microenxertia. Areia – PB, 2017.....45
- Figura 6.** Comparação da contaminação presente no microenxerto (A) e na estaca colocada diretamente no meio de cultura passado os sete dias de quarentena (B). Areia – PB, 2017.....46
- Figura 7.** Percentagem de contaminação, mortalidade e pegamento dos microenxertos de *Myrciaria jaboticaba*. Areia – PB, 2017.....47
- Figura 8.** Escurecimento caracterizando a morte dos microenxertos *Myrciaria jaboticaba*. Areia – PB, 2017.....48
- Figura 9.** Pegamento dos microenxertos, evidenciado pela coloração esverdeada. Enxerto proveniente de plântulas cultivadas *in vitro* (A, B, C) e enxerto proveniente de enxerto proveniente de planta em condições do campo (D), Areia – PB. 2017.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resumo da análise de variância para germinação das sementes de jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i>). Areia - PB, 2017.....	26
Tabela 2.	Germinação das sementes de jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i>) de acordo com tipo de meio de cultura e do uso ou não de antibiótico. SA.: Sem antibiótico; E.S.A.: Embebição de sementes no antibiótico; A.M.: Antibiótico no meio de cultura. Areia - PB, 2017.....	28
Tabela 3.	Índice de velocidade de germinação (IVG); percentagem de oxidação, poliembrionia e contaminação das sementes de (<i>Myrciaria jaboticaba</i>) em função dos dois tipos de meio. Areia - PB, 2017.....	28
Tabela 4.	Índice de velocidade de germinação (IVG); percentagem de oxidação, poliembrionia e contaminação das sementes de (<i>Myrciaria jaboticaba</i>) em função do uso ou não de antibiótico. S.A.= Sem utilização do antibiótico; E.S.A.= Embebição de sementes no antibiótico; A.M.= Antibiótico no meio de cultura. Areia – PB, 2017.....	29
Tabela 5.	Número de raiz, número de folhas; comprimento da maior raiz e da parte aérea; presença de ramificação das sementes de (<i>Myrciaria jaboticaba</i>) em função dos dois tipos de meio Areia – PB, 2017.....	30
Tabela 6.	Número de raiz, número de folhas; comprimento da maior raiz e da parte aérea; presença de ramificação das sementes de (<i>Myrciaria jaboticaba</i>) em função do uso ou não de antibiótico. S.A.= Sem utilização antibiótico; E.S.A.= Embebição de sementes no antibiótico; A.M.= Antibiótico no meio de cultura. Areia – PB, 2017.....	31

RESUMO

SANTOS, S. K. **Ação de antibiótico na germinação e microenxertia *in vitro* de *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.** Areia, 2017. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal da Paraíba.

A jabuticabeira *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg é originária da Mata Atlântica. A semeadura é a principal forma de sua propagação, apresenta um longo intervalo entre semeadura e início da germinação e após germinação, ocorre um grande período juvenil, refletindo na característica extrativista dessa frutífera. O presente trabalho visou contribuir com informações sobre a propagação de *M. jaboticaba*. Os experimentos foram realizados durante os anos de 2016 e 2017, no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais, no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba (LABCULTIVE/CCA/UFPB). No capítulo 1, buscou-se obter a germinação *in vitro* da jabuticabeira. Para tanto, testou-se dois tipos de meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, líquido e semi-sólido, onde semeou-se sementes que sofreram os seguintes tratamentos: sementes embebidas por 24 horas em água autoclavada; sementes embebidas por 24 horas em água autoclavada + antibiótico na embebição; sementes embebidas por 24 horas em água autoclavada + antibiótico no meio de cultivo. Avaliou-se a germinação, o Índice de Velocidade de Germinação (IVG), presença de oxidação, contaminação, número de raiz e folhas, comprimento de maior raiz e parte aérea. No Capítulo 2, as plântulas provenientes da germinação *in vitro* foram testadas para a avaliação do potencial da microenxertia *in vitro*. A microenxertia foi realizada tendo como porta-enxerto as plântulas que se desenvolveram *in vitro* e como enxerto: 1- estacas também provenientes do cultivo *in vitro*; 2- estacas de cultivo *ex vitro* de uma planta proveniente de condição de desenvolvimento no campo, cujos ramos foram tratados com antibiótico por 24 horas e 3 - estacas de cultivo *ex vitro* de uma planta proveniente de condição de desenvolvimento no campo, cujos ramos não foram imersos no antibiótico. Foi avaliada a percentagem de pegamento dos enxertos, contaminação e mortalidade. Em relação ao tipo de meio de cultura, o líquido proporcionou melhor média para a germinação (84%), IVG (0,568%) e demais variáveis avaliadas. Não houve diferença estatística em nenhuma das variáveis analisadas em relação à utilização do antibiótico na embebição e a não utilização do mesmo. Na microenxertia a maior porcentagem de pegamento (80%), foi obtido quando se utilizou tanto o enxerto, como o porta enxerto, provenientes do cultivo *in vitro*. O meio de cultura líquido proporcionou melhores resultados quando comparado com meio semi-sólido, bem como a não utilização do antibiótico e a utilização do mesmo na embebição das sementes; o uso de antibiótico no meio de cultura, provavelmente, teve ação fitotóxica; o pegamento dos microenxertos foi obtido quando se usou o porta-enxerto e enxerto de plântulas provenientes do cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: Jabuticaba, Meio líquido, Sementes

ABSTRACT

SANTOS, S. K. **Antibiotic actions on the germination and micro grafting *in vitro* of *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.** Areia. 2017. 52f. Work of conclusion (Graduation in Agronomy) - Universidade Federal da Paraíba.

The jaboticabeira *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg originally from the Atlantic Forest. Has as the main form of propagation the seeds, it has as characteristics a long interval between sowing and beginning of germination and, after germination, it has a great juvenile period, reflecting in the extractive characteristic of this fruit. The present work aimed to contribute with information about the propagation of *M. jaboticaba*. The experiments were carried out during the years 2016 and 2017, at the Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais, in the Centro de Ciências Agrárias, of the Universidade Federal da Paraíba (LABCULTIVE/CCA/UFPB). In chapter 1 were tried to obtain the *in vitro* germination of the jaboticabeira for this purpose. Two types of liquid and semi-solid culture medium ½ MS were tested, in which seeds that underwent the following treatments were sown: seeds soaked for 24 hours in autoclaved water; Seeds soaked for 24 hours in autoclaved water + antibiotic in imbibition; Seeds embedded for 24 hours in autoclaved water + antibiotic in the culture medium. Were evaluated the germination speed index, presence of oxidation, contamination, number of roots and leaves, length of bigger root and aerial part. In Chapter 2 seedlings from *in vitro* germinations were tested for the potential of micro grafting *in vitro*. The micro graftings were carried out having as rootstock the seedlings that were developed *in vitro* and as graft: 1- cuttings also coming from the culture *in vitro*; 2 - culture cuttings *ex vitro* of a plant from the developmental condition in the field, whose branches were treated with antibiotic for 24 hours and 3 - culture cuttings *ex vitro* of a plant coming from a field development condition, branches were not immersed in the antibiotic. All the cuttings contained a pair of axillary gems. The percentage of graft adhesion, contamination and mortality were evaluated. In relation to the type of culture medium, the liquid provided a better average for germination (84%), IVG (0.568%). There was no statistical difference in any of the analyzed variables in relation to the antibiotic imbibition use or not. In mycorrhiza, the highest percentage of survival (80%) was obtained when both the graft and the rootstock were used. The liquid culture medium provided better results when compared to semi-solid medium, as well as the non-use of the antibiotic and the use of the same in the imbibition of the seeds; The use of antibiotics in the culture medium probably had phytotoxic action; The micro grafting survival was obtained when using the rootstock and grafting of seedlings from the *in vitro* culture.

Key words: Jaboticaba, Liquid medium, Seeds

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil se destaca como sendo um país de grande produção de frutos tropicais nativos e cultivados, devido as suas condições climáticas. Na região Nordeste a fruticultura se constitui uma atividade econômica bastante promissora, devido ao sabor e aroma peculiares de seus frutos e à sua enorme diversificação (NORONHA et al., 2000). Dentre as diversas espécies frutíferas que podem ser encontradas nesta região, têm-se aquelas que pertencem à família Myrtaceae, como é o caso da jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*).

A jabuticabeira é conhecida há quase cinco séculos (ROSSA, 2010). Seu nome é originário do tupi, “iapoti’kaba”, que significa “fruta em botão” (MENDONÇA, 2000). Essa família é uma das mais utilizadas pelos índios, provavelmente devido à facilidade com que suas espécies aparecem espontaneamente nos roçados e capoeiras (ANJOS, 1998).

Apesar da boa ocorrência na região Nordeste, no Estado da Paraíba não se observa a formação de pomares desta frutífera, estando sua maior ocorrência nas regiões Sul e Sudeste. Segundo Sasso (2009), o ecossistema Floresta com Araucária, que abrange grande parte dos Estados do Sul do país, possui várias espécies frutíferas nativas comestíveis, principalmente as da família Myrtaceae, que constituem um patrimônio genético de grande valor. Por ser uma planta de origem subtropical, mas precisamente do Centro-Sul do Brasil, é adaptada ao clima tropical e tolera geada não intensa, vindo a se desenvolver bem em solos férteis, profundos e com bom suprimento de água o ano todo, principalmente nos períodos de floração e frutificação (SUGUINO et al., 2012).

M. jaboticaba pode ser utilizada em ornamentação, na qual através de técnicas específicas, as plantas ficam com tamanho menor, permitindo assim seu desenvolvimento em casas e apartamentos. Em alguns locais a jaboticaba ainda é considerada uma fruta de pomares caseiros, mas sua comercialização teve aumentos consideráveis nos últimos anos. Em 1980, a Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) comercializou cerca de 900.000 Kg de jaboticaba, dezoito anos depois chegou a comercializar cerca de 4,4 vezes mais (DONADIO, 2000). Dados recentes sobre a comercialização não foram encontrados na literatura. Segundo Suguino et al. (2012), em dados fornecidos pela CEAGESP, 95% da produção está concentrada nos meses de agosto a novembro, principalmente, em setembro.

A jaboticabeira é uma espécie, na qual não se tem grandes problemas com pragas e doenças, quando manejada de forma correta. A maior parte dos problemas de fitossanidade são causadas por podridão de raízes (*Rosellinia* sp.), com ocorrência em pomares mais velhos, sendo que não há tratamento efetivo para esta doença, ocasionando a morte da planta, e pela ferrugem (*Puccinia psidii*), considerada a principal doença da cultura, vindo a ocorrer em épocas quentes e chuvosas, atacando os frutos, sendo seu controle feito principalmente através de pulverizações com defensivos cúpricos, além do arejamento do pomar através de plantios mais largos e podas de ramos para permitir maior iluminação das plantas (SUGUINO et al., 2012).

Ao mesmo tempo em que desperta grande interesse entre os produtores devido às características inerentes a alta produção, benefícios à saúde e aproveitamento máximo dos frutos, acaba se tornando desestimulador a sua produção, devido ao tempo duradouro que requer para produção dos frutos. Segundo Kaneshiro (2002), as jaboticabeiras não têm despertado a atenção dos fruticultores, pela morosidade para o início da sua produção, que se inicia após 8 a 15 anos da semeadura no campo. Sendo assim, o seu longo período juvenil acaba se tornando um dos grandes entraves para a sua expansão.

Por se tratar de uma frutífera pouco cultivada, porém, com alto valor de mercado, com boas características organolépticas e elevado valor nutritivo, têm-se a necessidade de desenvolver novas tecnologias e protocolos de propagação, contribuindo com a exploração da cultura.

Com isto, este trabalho visa contribuir com informações sobre a micropropagação de *M. jaboticaba* (Vell.) Berg.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A Jabuticabeira (*Myrciaria jaboticaba*)

A jabuticabeira é originária da Mata Atlântica, mais precisamente do Centro-Sul do Brasil, pertence à família Myrtaceae e gênero *Myrciaria* (MANICA, 2000). Mas, houve uma alteração nomenclatural do gênero *Myrciaria* (Berg, 1857), para *Plinia*, que foi proposta por Sobral (1985). Todavia, o gênero *Myrciaria* é ainda utilizado, podendo ser considerado como sinonímia do gênero *Plinia* (SASSO, 2009).

Dentre as várias espécies de jabuticabas encontradas no país, a *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba “Paulista”) e a *M. jaboticaba* (jabuticaba “Sabará”) se destacam devido seus frutos serem apropriados para o consumo *in natura* (DONADIO, 2000), fabricação de derivados, como licores e geleias e também, na indústria farmacêutica e de cosméticos.

Apresenta copa com forma variada, porte médio a grande, com 6 a 9 m de altura, podendo alcançar até 12m com tendência a abundante esgalhamento, tendo como características típicas o hábito de frutificação nos ramos e troncos com ruptura da casca (ANDERSEN & ANDERSEN, 1989). A madeira da jabuticabeira é resistente, moderadamente pesada, compacta, elástica, dura e de longa durabilidade quando protegida das intempéries (BORGES & MELO, 2003).

O fruto da jabuticabeira é uma baga, subgloboso, negro quando maduro, liso, com 1,6 a 2,2 cm de diâmetro contendo de 1 a 4 sementes (WILBANK et al., 1983). Trata-se de um fruto frágil, com casca fina quando está maduro, com polpa geralmente adocicada de coloração translúcida ou branca.

Um dos motivos da grande procura desta frutífera deve-se ao fato de que a casca do fruto possui elevados teores de antocianinas e flavonóides (DANNER et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008). Estes compostos apresentam antioxidantes (PIETTA, 2000; WANG et al., 2000) e também atividades anticarcinogênicas (KAPADIA et al., 1997; HAGIWARA et al., 2001).

O método de propagação mais utilizada é de muda através de sementes, o que dificulta sua propagação em larga escala, já que propagação vegetativa por estaca, também apresenta dificuldades no enraizamento. Outras espécies da família Myrtaceae também apresentam a mesma dificuldade de enraizamento, como é o caso da goiabeira serrana (FRANZON et al., 2004), do guabijuzeiro, da cerejeira-do-mato e pitangueira

(COUTINHO et al., 1991). O método de produção de jabuticabeiras através de sementes faz com que a entrada em produção das plantas se torne lenta devido ao grande período juvenil que esse tipo de propagação acarreta (ANDRADE & MARTINS, 2003). Por isto, métodos alternativos, como a propagação *in vitro*, surgem como uma alternativa para obtenção de mudas mais vigorosas e com melhor padrão fitossanitário (PAIVA et al., 2002).

A propagação por meio de sementes pode ser afetada por diversos fatores internos e externos (MARTINS et al., 2008), que pode ser temperatura, umidade, luz, dormência da semente, microrganismos endofíticos, substrato, diâmetro da semente, entre outros. As informações existentes na literatura tanto sobre formas de propagação e formação de mudas de jabuticabeira são relativamente escassas. A literatura aborda principalmente a influência de temperatura, luz, umidade, substrato, tamanho do recipiente, maturação de frutos na germinação, caracterização físico-química e sensorial (ALEXANDRE et al., 2006; DANNER et al., 2007; BOESSO, 2014).

Algumas sementes de jabuticaba apresentam mais de um embrião, sendo a elas atribuído o nome de poliembrionicas. Segundo Salla (2016), a ocorrência da poliembrionia das sementes de jabuticaba pode ser devido à formação de embriões por apomixia (assexualmente), os quais geram plântulas clones da planta matriz. Para a mesma autora, acredita-se que o sistema de reprodução da jabuticabeira pode ser do tipo misto, que inclui além da apomixia, a geração de plântulas de uma progênie por cruzamento e autofecundação. Já conforme Donadio et al. (2002), todas as jabuticabeiras possuem sementes poliembrionicas, o número de embriões pode chegar até cinco.

As sementes podem ser classificadas como recalcitrante, na qual 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 rápida de viabilidade, podendo chegar até a morte (CHIN & ROBERTS, 1980). Estas espécies recalcitrantes, que possuem menor período de viabilidade, são originárias de regiões tropicais úmidas, onde se inclui a jabuticaba (FERREIRA & SANTOS, 1993). Já que essas sementes perdem rapidamente o poder germinativo é necessário que a semeadura ocorra durante a primeira e segunda semana após ter sido extraída do fruto. Sobretudo as sementes começam a perder a viabilidade quando a umidade está abaixo de 7,5%, sendo, portanto, sensíveis à dessecação, o que comprova seu comportamento recalcitrante (DONADIO, 2000).

2.2. A Micropropagação de Plantas

A capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* para formar gemas, raízes ou embriões somáticos, tem despertado a atenção de pesquisadores em virtude de sua grande implicação prática e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e genética de plantas (KERBAUY, 1999).

A micropropagação *in vitro* se apresenta como uma técnica da cultura de tecidos vegetais, que por sua vez está contida na área da biotecnologia vegetal, onde está o foco de muitos trabalhos acadêmicos. Trabalhos que são realizados em laboratórios contribuem não só com o avanço acadêmico, mas também, com as metodologias que serão aplicadas na prática, ou seja, lançadas no mercado. Esta técnica visa tanto propagar espécies que tenham dificuldade de se perpetuar na natureza, como também obter maior número de plantas uniformes em curto espaço de tempo. Por isto, a micropropagação tem se tornado bastante importante e tem sido realizada com sucesso em algumas espécies frutíferas, como o abacaxi, o morango e a banana (NUNES, 2005).

Explante é a dominação dada a uma célula, tecido ou órgão utilizado para iniciar o cultivo *in vitro*. O tipo e o tamanho do explante determinam suas chances de sobrevivência e desenvolvimento (WILLADINO & CÂMARA, 2005). Ele deve ser selecionado cuidadosamente, pois muitas vezes, o tipo define o grau de sucesso na micropropagação, onde aqueles explantes juvenis provenientes de sementes e partes juvenis de plantas adultas são os preferidos, embora tecidos maduros também sejam utilizados (CARVALHO et al., 2006). Os explantes devem preferencialmente ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse e ataque de pragas ou doenças (TEIXEIRA, 2005). Os tipos de explantes que podem ser utilizados no cultivo *in vitro* são sementes, raízes, caule, folhas, gemas axilares, gema meristemática, entre outros.

A oxidação ou escurecimento dos tecidos cultivados *in vitro* ocorre pela ação de radicais livres de diferentes componentes celulares, assim como pela oxidação de compostos fenólicos catalisados pela enzima polifenol oxidase (PPO) para produzir quininas, as quais são compostos muito reativos, gerando danos e inclusive a morte celular (BRAY et al., 2000). O estabelecimento de fruteiras lenhosas é mais dificultoso, já que são mais vulneráveis aos danos causados pela oxidação, podendo acarretar na morte do

explante. Este é um dos mais sérios problemas encontrados no cultivo *in vitro* de um tecido (TANG & NEWTOM, 2004).

Na propagação *in vitro*, quando a contaminação é exógena, há possibilidades de controlar os microrganismos, mas as consequências podem ser limitantes quando a contaminação é endógena, (SOUZA & JUNGHANS, 2006). Em trabalho conduzido por Santos et al. (2015), houve contaminação de 100% das sementes de jabuticabeira cultivadas *in vitro*, submetidas a embebição por 24 horas. As bactérias endógenas podem acarretar na perda de material genético e recursos financeiros (SOUZA & JUNGHANS, 2006). Por este motivo, para que alguns materiais vegetais possam ser propagados aconselha-se a utilização de antibióticos para diminuir ou eliminar a contaminação patogênica, já que a presença destes pode causar a perda dos explantes.

Os antibióticos podem possuir tanto ação bacteriostática, e não bactericida, como também podem ser fitotóxicos e favorecer alterações nas respostas morfogênicas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PALÚ et al., 2011). Segundo Dantas et al. (2002), na cultura de tecidos é preciso prevenir e controlar a contaminação microbiana, já que o meio de cultura favorece um ambiente ideal para o crescimento de bactérias e fungos. No trabalho realizado por Pereira et al. (2003), a adição dos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina, em concentrações que variaram de 32 a 256 mg.L⁻¹, inibiram o crescimento de bactérias contaminantes no cultivo *in vitro* da batata (*Solanum tuberosum*). Palú et al. (2011), utilizaram antibióticos para controlar a ação de bactérias endógenas com intuito de micropropagar a figueira, onde a ampicilina sódica, em concentração de 250 mg.L⁻¹, proporcionou a inibição do crescimento de bactérias *in vitro*, após a inoculação de gemas apicais de figueira, favorecendo assim a sobrevivência de mais de 90% de explantes.

A germinação de sementes de jabuticabeira parece está fortemente comprometida com a presença de bactérias endógenas. Santos et al. (2015), trabalhando com cultivo de jabuticabeira *in vitro* obtiveram uma média de germinação de 52,5% e valor de IVG de 0,32 de sementes obtidas de frutos verdes e maduros embebidas por 48 horas em água autoclavada, onde mesmo contaminadas, algumas sementes conseguiram se desenvolver, porém com baixa uniformização. Já Cardoso et al. (2015), também trabalhando com cultivo de jabuticabeira *in vitro* observaram a contaminação de 25% em sementes de jabuticaba sem tegumento que ficaram 15 minutos no hipoclorito de sódio a 2,5%.

A microenxertia surgiu como alternativa economicamente viável, em curto prazo, para controle de doenças, principalmente de origem virótica e bacteriana (SINGH et al., 2008), no resgate de embriões (SIMON & LITZ, 2005) e detecção de alguns casos de incompatibilidade (DANTHU et al., 2004; WU et al., 2007). Esta técnica consiste na transferência de um pequeno fragmento do ápice caulinar ou gema axilar para um porta-enxerto, podendo ser realizada *in vitro* ou *ex vitro*, em condições assépticas (GEORGE, 1993).

A microenxertia, ainda possibilita obter plantas livres de pragas (MENDES, 2013), permite realização da caracterização morfológica dos microenxertos (ANSELMINI & ZANETTE, 2008), possibilita a realização de estudos histológicos (ABREU et al., 2003), e fisiológicos nas enxertias. Com a finalidade de superar problemas de enraizamento *in vitro*, a microenxertia das brotações regeneradas, sobre porta-enxertos estiolados, tem sido utilizada com sucesso para aumentar a eficiência de recuperação de plântulas (GHORBEL et al., 1998). A associação das técnicas de micropropagação e microenxertia pode contribuir na produção de mudas livres de patógenos, com alto padrão genético, uniformes em curto espaço de tempo, em qualquer época do ano, e auxiliar na diminuição do longo período de juvenilidade de algumas espécies, como é o caso da jabuticabeira.

Latado et al. (2007), tiveram como objetivo em seu trabalho a obtenção de plantas autotetraplóides de tangor 'Murcott', tangerina 'Ponkan' e laranja 'Pêra-de-abril' com características agrônomicas superiores, por meio do cultivo de segmentos de epicótilos em meio contendo colchicina, seguido de regeneração de brotações adventícias e microenxertia *in vitro* Coutinho et al. (2010), ao realizarem a microenxertia de tomateiro utilizando a jurubebeira como micro-porta-enxertos através de dois métodos de corte, o T-invertido e em bisel, verificaram que o método em T-invertido mostrou-se mais eficiente do que o corte em bisel, atingindo, ao final de quatro semanas, 50% de sobrevivência; já a taxa de sobrevivência dos microenxertos do corte em bisel foi nula. Resultados parecidos foram obtidos por Gulati et al. (2001) e Mneney & Mantell (2001).

2.3. Meios de Cultura

Os meios de cultura são preparações químicas utilizadas no cultivo *in vitro* que oferecem as condições necessárias ao crescimento e desenvolvimento das plantas (BUTCHER & INGRAN, 1976). O uso de dosagens adequadas de reguladores de

crescimento e vitaminas são indispensáveis para na preparação dos meios de cultura (SOUZA et al., 2003). Segundo Brown e Thorpe (1986), as composições físicas e químicas dos meios de cultura são decisivas no desenvolvimento dos explantes.

Os meios de cultivo são formados pela homogenização de macronutrientes, micronutrientes, reguladores de crescimento, vitaminas e carboidratos. Segundo Quisen & Angelo (2008), há vários tipos de meio de cultura, que são: Meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), que é utilizado em todo mundo, se caracterizando pela alta concentração de sais, sendo direcionado especialmente para cultura de meristema, regeneração de plantas e morfogênese, neste ainda pode-se reduzir a quantidade de sais pela metade dependendo do tipo de explante, sendo denominado de MS reduzido ($\frac{1}{2}$ MS); Meio B5, que foi desenvolvido por Gamborg et al. (1968), e possui quantidades mais razoáveis de sais minerais; Meio WPM -Wood Plant Medium - (Lloyd & Mc Cown, 1981), que é mais utilizado em laboratórios comerciais para propagação de arbustos e árvores; entre outros.

Essas preparações químicas podem ser utilizadas na forma líquida ou semi-sólida. Neste último, se faz uso de substâncias geleificantes, como é o caso do ágar, que é o mais utilizado, porém outros produtos podem ser aplicados, como agarose, amido, entre outros (QUISEN & ANGELO, 2008). Os mesmos autores ainda afirmam que outras substâncias podem ser inseridas nos meios de culturas com finalidades específicas, como fungicidas e antibióticos, para controle da contaminação endógena e/ou exógena, e do carvão ativado, para adsorção de substâncias tóxicas, como os fenóis. Correia et al. (1995), cultivaram clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em meio cultura sólido e líquido, obtendo maiores médias de produção de matéria fresca e produção de matéria seca aos 42 dias em meio sólido. O cultivo em meio MS líquido apresentou o menor índice de multiplicação em abacaxizeiro e bananeira (COSTA, et al. 2007).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. F. ABREU, M. F.; NUNES, J. C. O.; SANTOS, M.; PEDROTTI, E. L. Estudos histológicos preliminares da microenxertia de plantas micropropagadas de macieira. **Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p.195-196, 2003.

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**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 227-230, 2006.

ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V. U. **As frutas silvestres brasileiras**. Rio de Janeiro: Globo, 203p. 1989.

ANDRADE, R. A.; MARTINS, A. B. G. Influence of the temperature in germination of seeds of jaboticaba tree. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 197-198, 2003.

ANJOS, A. M. G. **Morfologia e fisiologia da germinação de sementes de araçá-boi *Eugenia stipitata* ssp. *sororia* McVauger – Myrtaceae), uma frutífera nativa da Amazônia Ocidental**. 1998. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Universidade do Amazonas, Manaus, 1998.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 967-973, 2008.

BOESSO, F. F. **Caracterização físico-química, energética e sensorial de refresco adoçado de jaboticaba**. 2014. 75 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2014.

BORGES, M. H. C. B.; MELO, B. **Cultura da jaboticabeira**. [2003]. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/jaboticaba.html>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

BRAY, E; BAILEY–CSERRES, J; WERETILNYK, E. Responses tour abiotic stress. In: BUCHANA, B; GRUISSEM, W; JONES, R (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of plants**. Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists, p. 1158-1203, 2000.

BROWN, D. C. W.; THORPE, T. A. **Plant regeneration by organogenesis**. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orland: Academic, 1986. v. 3, p. 49-73.

BUTCHER, W. P.; INGRAN, D. S. **Organs and embryos**. In: **Plant Tissue Culture**. [s. l.]: CIDADE?: Edward Publishing Limited. p. 3-15, 1976.

CARDOSO, B. P.; FERREIRA, T. R.; MARCONDES, A. F.; STEIN, V. C. **Desinfestação de sementes de jaboticaba oriundas da região do Sudoeste Goiano**. In: 20º Congresso

Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e 7º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2015.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa, 2006. 28 p.

CHIN, H. F.; ROBERTS, E. H. **Recalcitrant crop seed**. Malaysia: Tropical Press SDN. BHD, 152p, 1980.

COSTA, F. H. S. PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P.; PEREIRA, J. E. S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 41-46, 2007.

CORREIA, D.; G, A. N.; C, H. Y. Z.; Ribeiro, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF, Piracicaba**, v. 48, n. 49, p. 107-116, 1995.

COUTINHO, E. F. MIELKE, M. S.; ROCHA, M. S.; DUARTE, O. R. Enraizamento de estacas semi-lenhosas de fruteiras nativas da família Myrtaceae com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.13, n.1, p.167-171, 1991.

COUTINHO, O. L. REGO, M. M.; REGO, E. R.; KITAMURA, C. K.; MARQUES, L. F.; FARIAS FILHO, L. P. Desenvolvimento de protocolo para microenxertia do tomateiro *Lycopersicon esculentum* Mill. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 87-92, 2010.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; FERNANDES JÚNIOR, A. A.; ASSMANN, A. P.; MAZARO, S. M.; SASSO, S. A. Z. Formação de mudas de jaboticabeira (*Plinia* sp.), em diferentes substratos e tamanhos de recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 179-182, 2007.

DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; CITADIN, I.; AMBROSIO, R.; SACHET, M. R.; MAZARO, S. M. Variabilidade da qualidade de frutos de jaboticabeiras de diferentes sítios de ocorrência da região sudoeste do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, Vitória, 2008. **Anais...** Vitória: Sociedade Brasileira de Fruticultura. 1 CD-ROM, 2008.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo in vitro de plantas. In: LUZ, W. C. da (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 10. ed. Passo Fundo: Passo Fundo: RAPP. v.10, p. 391-407, 2002.

DANTHU, P.; TOURÉ, M. A.; SOLOVIEV, P.; SAGNA, P. Vegetative propagation of *Ziziphus mauritiana* var. Gola by micrografting and its potential for dissemination in the Sahelian Zone. **Agroforestry System**, v. 60, n. 3, p. 247-253, 2004.

DONADIO, L. C. **Jaboticaba** (*Myrciaria jaboticaba* Vell. Berg). Jaboticabal: FUNEP, 55p, 2000.

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

FERREIRA, S. A. N.; SANTOS, L. A. Efeito da velocidade de secagem sobre a emergência e vigor de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, v. 23, n 1, p 3 – 8, 1993.

FRANZON, R. C.; ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B. Efeito do AIB e de diferentes tipos de estaca na propagação vegetativa de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 4, p. 515-518, 2004.

GAMBORG, O.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GEORGE, E. F. Equipment and Procedures. In: _____ **Plant propagation by tissue culture**. 2 d., Eversley: Exegetics. p. 116-117. Part 1: The technology, 1993.

GHORBEL, R.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 323-327, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI, 1998. v.1, p.183-260.

GULATI, A.; SCHRYER, P.; MCHUGHEN, A. Regeneration and micrografting of lentil shoots. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 6, p. 798-802, 2001.

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, K.; NAKANISHI, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; KADOTA, T.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; IMAIDA, K.; ITO, N.; SHIRAI, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pre-treated with 1,2- dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, Oxford, v. 171, n. 1, p. 17-25, 2001.

KANESIRO, M. A. B. **Efeito da irradiação gama em embalagens na conservação pós colheita de jabuticabas (*Myrciaria* sp.)**. 2002. 136 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Agrônômica) – Faculdade de Agronomia Dr. Francisco Maeda, Ituverava, 2002.

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

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e**

transformação genética de plantas. Brasília. Embrapa - SPI / Embrapa – CNPH, 1999. v. 2, p. 519-531.

LATADO, R. R.; YALY, M. C.; CARVALHO, C. R.; MACHADO, M. A. Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p.1429-1435, 2007.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416, 1981.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 1: técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biribá, carambola, cereja-do-rio-grande, jaboticaba.** Porto Alegre, Cinco Continentes. 327p, 2000.

MARTINS, C. C.; CAMARA, A. T. R.; MACHADO, C. G.; NAKAGAWA, J. Métodos de superação de dormência de sementes de Barbatimão. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 381-385, 2008.

MENDES, M. I. S. **Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de citros visando a obtenção de plantas livres de doenças.** 2013, 35p. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Cruz das Almas - BA, 2013.

MENDONÇA, R. M. N. **Maturação, secagem e armazenamento de sementes e propagação vegetativa de jaboticabeiras (*Myrciaria* sp.).** Viçosa, 2000. 136 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. ***In vitro* micrografting of cashew.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 66, n. 1, p. 49-58, 2001

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

NORONHA, M. A. S.; CARDOSO, E. A.; DIAS, N. S. Características físico-químicas de frutos de umbu-cajá *Spondias* sp. provenientes dos pólos baixo Jaguaribe (CE) e Assu-Mossoró (RN). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 2, n. 2, p. 91-96, 2000.

NUNES, J. C. O. ABREU, M. F.; DANTAS, A. C. M.; PEREIRA, A. J.; PEDROTTI, E. L. Caracterização morfológica de microenxertia em macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 80-83, 2005.

PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; SANTANA, J. R. F.; PAIVA, P. D. O.; DOMBROSKI, J. L. D.; SANTOS, B. R. Espécies frutíferas com potencial econômico: avanços no processo de propagação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 78-84, 2002.

PALÚ, E. G.; CORREA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592. 2011.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 7, p. 1035- 1042, 2000.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecido da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44 p.

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* (jabuticabeira) em função de diferentes tratamentos pré-germinativos. **Floresta**, Curitiba, v. 40, n. 2, p.371-378, 2010.

SALLA, V. P. **Apomixia determinando a estrutura genética de uma população de plinia cauliflora no sudoeste do Paraná**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

SANTOS, S. K.; PEREIRA, S. S.; COSTA JÚNIOR, O. D.; SANTOS, L. A.; COSTA, N. P. **Germinação in vitro de jabuticabeira** (*Myrciaria jaboticaba*). In: 20º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e 7º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2015.

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

SIMON, H. T.; LITZ, R. E. Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, n. 1, p. 1-9, 2005.

SINGH, B.; SHARMA, S.; RANI, G.; HALLAN, V.; ZAIDI, A. A.; VIRK, G. S; NAGPAL, A. *In vitro* micrografting for production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV)-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora). **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2, p. 137-143, 2008.

SOUZA, A. V., PINTO, J. E. B. P., BERTOLUCCI, S. K. V., CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, v, 27, p. 1532-1538, 2003.

SOUZA, A. S.; T. L; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. 152 p.

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

SUGUINO, E. MARTINS, A. N.; TURCO, P. H. N.; CIVIDANES, T. M. S.; FARIA, A. M. A cultura da jaboticabeira. **Revista Pesquisa & Tecnologia**, [S.l.] v. 9, n. 1, p.7, 2012.

TANG, W; NEWTON, R. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polymines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant science**, v.167, n, 3, p. 621-628, 2004.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, [2005].

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

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

WILBANK, M. V.; CHALFUN, N. N. J.; ANDERSEN, O. O. **The jaboticaba in Brazil**. Proceedings of the Americans Society for Horticatural Science, Alexandria, v. 27, p. 57-69, 1983.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. 2005. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

WU, H. C.; TOIT, E. S.; REINHARDT, C. F. Micrografting of *Protea cynaroides*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 23-28, 2007.

**CAPÍTULO 1: GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE JABUTICABEIRA *Myrciaria*
jaboticaba (VELL.) BERG**

**CHAPTER 1: *IN VITRO* GERMINATION OF JABUTICABEIRA *Myrciaria*
jaboticaba (VELL.) BERG**

RESUMO

O cultivo *in vitro* é uma técnica que vem sendo utilizada em larga escala na produção de mudas de diversas espécies frutíferas, otimizando a germinação e o desenvolvimento das plântulas. Fazendo uso desta técnica, as mudas se desenvolvem em condições assépticas, livres de patógenos. Neste sentido, o presente trabalho objetivou determinar a influência do uso de antibiótico na germinação de sementes e desenvolvimento das plântulas de jaboticabeira (*Myrciaria jaboticaba*) cultivadas *in vitro*. O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba (LABCULTIVE/CCA/UFPB). O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2x3, sendo sementes embebidas por 24 horas em água autoclavada; sementes embebidas por 24 horas em água autoclavada + antibiótico na embebição; sementes embebidas por 24 horas em água autoclavada + antibiótico no meio de cultivo; e dois tipos de meio de cultura, líquido e semi-sólido, totalizando seis tratamentos. Foram avaliadas as variáveis: germinação, IVG, oxidação, contaminação, número de raiz e folhas, maior raiz e parte aérea, e presença de ramificações. A maior média de germinação (84%) foi obtida quando as sementes ficaram embebidas por 24 horas em água autoclavada + antibiótico e quando colocadas em meio líquido. Em todas as variáveis analisadas o meio líquido proporcionou melhores médias, incluindo a menor porcentagem de oxidação (8%), já no meio semi-sólido a porcentagem foi de 15,33%. Não houve diferença estatística em nenhuma das variáveis analisadas em relação à utilização do antibiótico na embebição e a não utilização do mesmo. Contudo, pode-se concluir que as sementes de *Myrciaria jaboticaba* têm maior germinação e melhor desenvolvimento no meio de cultura líquido; a não utilização do antibiótico e utilização do mesmo na embebição proporcionou melhores resultados; a presença do antibiótico no meio de cultura provavelmente causou fitotoxidade, comprometendo assim a germinação e desenvolvimento das plântulas.

Palavras-chave: Antibiótico, Contaminação endógena, Poliembrião

ABSTRACT

The *in vitro* cultivation is a technique that has been used in large scale in the production of seedlings of several fruit species, optimizing the germination and development of the seedlings. Using this technique, the seedlings develop under aseptic conditions, free of pathogens. In this sense, the present work aimed to determine the influence of antibiotic use on seed germination and development of jaboticabeira (*Myrciaria jaboticaba*) seedlings grown *in vitro*. The experiment was carried out at the Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais, in the Centro de Ciências Agrárias, of the Universidade Federal da Paraíba (LABCULTIVE/CCA/UFPB). The experiment was conducted in a completely randomized design, with factorial scheme 2x3, having the seeds embedded for 24 hours in autoclaved water; seeds soaked for 24 hours in autoclaved water + antibiotic in imbibition; seeds soaked for 24 hours in autoclaved water + antibiotic in the culture medium; And two types of culture medium, liquid and semi-solid, totalizing six treatments. Were evaluated the germination, ISG, oxidation, contamination, root and leaf number, bigger root and aerial part, and presence of branches. The best germination average (84%) was obtained when the seeds were soaked for 24 hours in autoclaved water + antibiotic and when placed in a liquid medium. In all analyzed variables, the liquid medium provided better means, including lower percentage of oxidation (8%), in the semi-solid medium the percentage was 15.33%. There was no statistical difference in any of the variables analyzed in relation to the use of the antibiotic in the imbibition and the non-use of the same. However, it can be concluded that seeds of *M. jaboticaba* has higher germination and better development in liquid culture medium; use of the antibiotic in the imbibition and the non-use provided better results; presence of the antibiotic in the culture medium most likely can cause phytotoxicity compromising germination and development of the seedling.

Key words: Antibiotic, Endogenous contamination, Polyembryony

1. INTRODUÇÃO

Uma das formas de multiplicação da jabuticabeira (*Myrciaria jaboticaba*) é via seminífera. Porém, pode ser propagada por estaquia e mergulhia, mas são métodos menos utilizados, devido à dificuldade de enraizamento, característica da espécie (MANICA, 2000). Apesar do aumento considerável de conhecimento relativo à análise de sementes de espécies frutíferas, a maioria delas carece de subsídios básicos referentes às condições ideais de germinação (OLIVEIRA et al., 2005).

Vários fatores sejam intrínsecos ou extrínsecos, interferem no processo germinativo das sementes, como por exemplo, a temperatura, umidade, dormência da semente, luminosidade, tipo de substrato, beneficiamento, presença de microrganismos endógenos, entre outros. Para Garcia (1994), o controle da temperatura no processo germinativo é de grande importância, já que influencia a maioria dos processos bioquímicos e fisiológicos durante a germinação de sementes.

As sementes de jaboticaba além de iniciar sua germinação tardiamente, também apresentam desuniformidade na germinação, ocasionando revés na perpetuação da espécie, prejudicando principalmente, a produção de mudas. Segundo Donadio (2000), a germinação das sementes de jabuticabeira pode iniciar de 10 a 40 dias após sua semeadura, dependendo das condições em que as mesmas se encontram. Em trabalho realizado por Rossa et al. (2010), a germinação de sementes completamente limpas ocorreu aos 40, 60 e 90 dias em uma porcentagem de 76, 89 e 98, respectivamente.

Entre os fatores que influenciam na produção de mudas, destacam-se, além das sementes, os recipientes e o substrato utilizado, os quais vão refletir diretamente na qualidade do produto final (CARNEIRO, 1995). Tanto as medidas de controle, como as medidas de prevenção da contaminação microbiana, são primordiais para o sucesso da cultura de tecidos (SILVA et al., 2003), já que ocorre competição entre os explantes e os microrganismos pelos nutrientes do meio de cultivo, podendo provocar a morte do material vegetal.

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de reduzir o tempo necessário entre a semeadura e a emergência das plântulas, bem como para aumentar a tolerância das sementes às condições adversas durante a germinação (ROSSA et al., 2010). Existem pesquisas que indicam alguns métodos de semeadura e técnicas pré-germinativas que proporcionam o aumento do potencial germinativo das sementes de *M. jaboticaba*, mas é

necessário maior aprofundamento nesses estudos, criando assim protocolos padrões. Segundo Rossa et al. (2010), aparentemente, as diferentes espécies de jabuticabeira não apresentam dormência das sementes, porém estudos podem indicar técnicas que melhorem a sincronização de germinação das sementes e o vigor das mudas formadas, aumentando o seu potencial de desempenho e, por conseguinte, a uniformidade das plantas em condições de campo.

As mudas de jabuticabeira produzidas com qualidade e adequadamente manejadas originam pomares produtivos e rentáveis (CHALFUN & PIO, 2002). Mexal & Landis (1990), também sugerem que a qualidade da mudas é de fundamental importância. Para Rose et al. (1990), uma muda padrão é determinada por características morfológicas (estruturais) e fisiológicas. Estas, por sua vez, são definidas por fatores genéticos (propágulos) e ambientais (tratos culturais no viveiro) (ROSSA, 2010).

Por possuir longo intervalo entre semeadura e início da germinação, consequentemente a formação das mudas de jabuticaba também será tardia, por isto, é necessário atenção na hora da escolha do material utilizado na propagação, devendo este ser oriundo de uma planta matriz com boas características genéticas e livre de pragas e doenças, pois caso esteja infectado por patógenos ou possua alguma doença, o processo germinativo poderá ser mais tardio ou não ocorrer. Além do mais, é este material que dará origem aos futuros pomares de jabuticabeira.

O cultivo *in vitro* é uma técnica que vem sendo utilizada em larga escala na produção de mudas de diversas espécies frutíferas. Fazendo uso desta técnica, as mudas se desenvolvem em condições assépticas, livres de patógenos, tratando-se, portanto, de um mercado que vem crescendo exponencialmente, já que os produtores procuram mudas que não venham a comprometer a boa formação do pomar. Segundo Erig & Schuch (2003), o cultivo *in vitro*, constitui uma estratégia importante para solucionar problemas relacionados à propagação, melhoramento genético clássico e biotecnologia de plantas, especialmente das lenhosas perenes.

Uma das técnicas da cultura de tecidos mais utilizadas é a micropropagação, que, atualmente, é responsável em produzir mudas de várias espécies com finalidades comerciais (PEREIRA, 2004). Sendo assim, esse meio de propagação influencia nas formas de prevenção e controle de contaminação e oxidação, tornando-se relevante determinar protocolos para o estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *M. jaboticaba*.

É necessário evitar a contaminação microbiana, através de medidas preventivas, para que se tenha sucesso na propagação *in vitro*. Em alguns casos, há necessidade de adicionar antibióticos ao meio de cultura para o controle de microrganismos (REED et al., 1998; ERIG & SCHUCH, 2003; PEREIRA et al., 2009). A utilização de antibióticos é de grande importância no controle de bactérias endógenas, que frequentemente causam problemas no estabelecimento de culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Porém, o uso dessas substâncias pode acarretar problemas, uma vez que podem apresentar níveis consideráveis de toxidez ao tecido vegetal (SCORTICHINI & CHIARIOTTI, 1988).

O escurecimento encontrado nos meios de cultura tem sido atribuído à liberação e oxidação de compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante (MELO et al., 2001). Alguns materiais vegetais, geralmente os que possuem características lenhosas, são mais susceptíveis aos danos causados pela oxidação. Preece & Compton (1991), caracterizaram as substâncias encontradas em meio de cultura para algumas espécies lenhosas e as identificaram como sendo fenóis, flavonóides e taninos, e responsáveis pela oxidação. Em trabalho realizado por Santos et al. (2015), houve oxidação de todas as sementes de jaboticabas, que continham tegumento, cultivadas *in vitro*, onde nenhuma delas germinou. Uma das formas de minimizar a oxidação dos explantes é utilizando o carvão ativado no meio de cultura. O carvão ativado, segundo Pasqual & Pinto (1988), por absorver substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, pode promover o crescimento dos embriões.

Alguns explantes, ao entrar em contato direto com o meio, têm seu desenvolvimento afetado, portanto se faz uso de “pontes” que funcionem como elo entre o explante e o meio de cultura líquido, além do mais, diminuem os custos de produção dos meios de cultura. Ao ser utilizado meio sólido é possível que as concentrações ótimas de sais sejam mais elevadas do que as concentrações ótimas para o crescimento em meio líquido, devido às restrições na velocidade de difusão de nutrientes que o meio sólido impõe (CALDAS et al., 1990).

Neste sentido, o presente trabalho objetivou determinar a influência do uso de antibiótico e consistência do meio, na germinação e desenvolvimento de jaboticabeira (*M. jaboticaba*) cultivadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais (LABCULTIVE), no Departamento de Ciências Biológicas (DCB), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), durante 2016 e 2017. Os frutos da jaboticabeira foram colhidos de uma planta matriz localizada no sítio Macacos, zona rural do município de Areia – PB. Os mesmos foram lavados em água corrente para retirada do excesso de impurezas.

2.1. Preparação das Sementes de *Myrciaria jaboticaba*

Após a lavagem dos frutos, os mesmos foram selecionados, deixando apenas os que apresentavam características fitossanitárias adequadas e ausência de danos físicos. As sementes foram retiradas manualmente dos frutos e a polpa foi eliminada através de lavagem com água corrente, com posterior secagem das sementes em temperatura ambiente, à sombra.

Após dois dias, já com as sementes secas, o tegumento foi retirado (Figura 1) e as mesmas passaram por um procedimento de desinfestação, sendo lavadas três vezes com água destilada autoclavada, em seguida, imersas em álcool 70% agitando por 30 segundos, e posteriormente lavadas por três vezes em água destilada autoclavada, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5%v/v), nesta última, houve agitação mecânica por 20 minutos e, por fim, foram lavadas por mais três vezes com água destilada autoclavada.



Figura 1. Preparação das sementes. Fruto após lavagem (A); Sementes com polpa recém retiradas do fruto (B); Sementes com tegumento após secagem à sombra (C); Sementes sem o tegumento (D). Areia – PB. 2017.

2.2. Preparação dos Meios de Cultura

O meio de cultivo utilizado foi o $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de $2,0 \text{ g/L}^{-1}$ de carvão ativado e de $7,0 \text{ g/L}^{-1}$ do ágar, este último foi utilizado apenas nos tratamentos 2, 4 e 6. Em seguida, os meios de cultura foram autoclavados a 120°C e 1,5 atm, por 20 minutos.

2.3. Tratamentos

2.3.1. Tratamento 1 – Germinação *in vitro* de sementes de jaboticaba embebidas por 24 horas e inoculadas em meio de cultura líquido

Após assepsia, as sementes foram postas para embeber por 24 horas em água destilada autoclavada. Em seguida passaram novamente pelo processo de desinfestação, seguindo a metodologia descrita no item 2.1., sendo que neste caso, após a agitação

mecânica por 20 minutos, a lavagem com água destilada autoclavada ocorreu na câmara de fluxo laminar, bem como, a transferência das sementes para tubos de ensaio que continham ponte de PVC (Policloreto de Vinilo) com papel filtro e o volume de 5 ml de meio de cultivo líquido.

2.3.2. Tratamento 2 – Germinação *in vitro* de sementes de jabuticaba embebidas por 24 horas e inoculadas em meio de cultura semi-sólido

A metodologia utilizada neste tratamento foi idêntica ao tratamento anterior, porém neste caso as sementes foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura semi-sólido com volume de 5 ml.

2.3.3. Tratamento 3 – Germinação *in vitro* de sementes de jabuticaba utilizando antibiótico na embebição por 24 horas e inoculadas em meio de cultura líquido

Após a assepsia, as sementes foram postas para embeber por 24 horas em água destilada autoclavada utilizando uma cápsula de antibiótico amoxicilina 500 mg L⁻¹ na embebição. Em seguida, passaram novamente pelo processo de desinfestação, sendo que neste caso após a agitação mecânica por 20 minutos, a lavagem com água destilada autoclavada ocorreu na câmara de fluxo laminar, bem como a transferência das sementes para tubos de ensaio que continham ponte de PVC com papel filtro e o volume de 5 ml de meio de cultivo líquido.

2.3.4. Tratamento 4 – Germinação *in vitro* de sementes de jabuticaba utilizando antibiótico na embebição por 24 horas e inoculadas em meio de cultura semi-sólido

A metodologia utilizada neste tratamento foi idêntica ao tratamento anterior, porém neste caso as sementes foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura semi-sólido com volume de 5 ml.

2.3.5. Tratamento 5 – Germinação *in vitro* de sementes de jabuticaba embebidas por 24 horas e inoculadas no meio de cultura líquido contendo antibiótico

Após assepsia, as sementes foram postas para embeber por 24 horas em água destilada autoclavada. Em seguida, passaram novamente pelo processo de desinfestação, sendo que neste caso, após a agitação mecânica por 20 minutos, a lavagem com água destilada autoclavada ocorreu na câmara de fluxo laminar, bem como a transferência das sementes para tubos de ensaio que continham ponte de PVC com papel filtro e o volume de 5 ml de meio de cultivo líquido, que por sua vez, continha uma cápsula de antibiótico amoxicilina 500 mg L⁻¹.

2.3.6. Tratamento 6 - Germinação *in vitro* de sementes de jabuticaba embebidas por 24 horas e inoculadas no meio de cultura semi-sólido contendo antibiótico

A metodologia utilizada neste tratamento foi idêntica ao tratamento anterior, porém neste caso as sementes foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura semi-sólido com volume de 5 ml.

Todos os cultivos foram mantidos em sala de crescimento na presença de luz com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2 °C.

2.4. Delineamento Experimental e Avaliações

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (Meios de cultivo x Antibiótico), totalizando 6 tratamentos com 5 repetições provenientes da média de 10 tubos, totalizando 300 sementes.

As avaliações ocorreram diariamente, onde foi avaliada a percentagem de germinação, que foi obtida após o início da instalação dos testes, computando-se o número de plântulas normais obtidas, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Avaliou-se o índice de velocidade de germinação (IVG), sendo calculado segundo a fórmula de Maguire (1962), em que: $IVG = G1/D1 + G2/D2 + \dots Gn/Dn$.

Onde:

IVG= Índice de Velocidade de Germinação

G1, G2, ..., Gn= nº de radículas emergidas, observadas no intervalo da 1ª, 2ª, ..., última contagem;

D1, D2, ..., Dn= nº de dias de semeadura à 1ª, 2ª, ..., última contagem.

Foi avaliada também a presença de contaminação e de oxidação. Quando as plântulas apresentaram tamanho entre 5 à 13 cm foram avaliadas presença de poliembrionia, tamanho da raiz, tamanho da parte aérea, número de folhas e presença de ramificação do caule.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SAS University 3.4.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a porcentagem de germinação das jabuticabeiras *M. jaboticaba*, verificou-se que houve interação entre a forma de uso do antibiótico e o tipo de meio de cultura (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para germinação das sementes de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*). Areia - PB, 2017.

Fonte de Variação	GL	QM	Pr>F
Meio	1	120.000	0.3522 NS
Antibiótico	2	280.000	0.1444 NS
Meio x Antibiótico	2	520.000	0.0342*

*Significativo a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

NS, não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

A germinação das sementes de jabuticabeira Sabará cultivadas *in vitro* iniciou-se no quarto e quinto dia após a semeadura com a utilização do meio líquido e semi-sólido, respectivamente (Figura 2), o que é uma precocidade bastante expressiva quando comparado com os estudos da literatura referente à germinação *ex vitro* como os encontrados por Santos et al. (2015), ao obterem a germinação dessas sementes de jabuticaba Sabará em 20 dias após o semeio em substrato composto por terra vegetal + vermiculita. No trabalho realizado por Wagner Júnior et al. (2011), a germinação das sementes de jabuticaba Sabará e de Cambinho com diâmetro menor que 6mm utilizando substrato Plantmax® iniciou aos 25 e 27 dias, respectivamente. Alexandre et al. (2006), avaliando o efeito do estágio de maturação e do substrato em condições *ex vitro* em jabuticabeira Sabará, observaram que a germinação teve início 18 dias após a semeadura. Segundo Wagner Júnior et al. (2007), a germinação de sementes de jabuticaba Paulista e de Cabinho colocadas em placas de Petri, individuais, contendo papel Germitest teve início aos sete dias após a semeadura quando expostas a 24 e 32 °C e quando tratadas com solução fungicida (Benlate 500 – 15 g.L⁻¹).

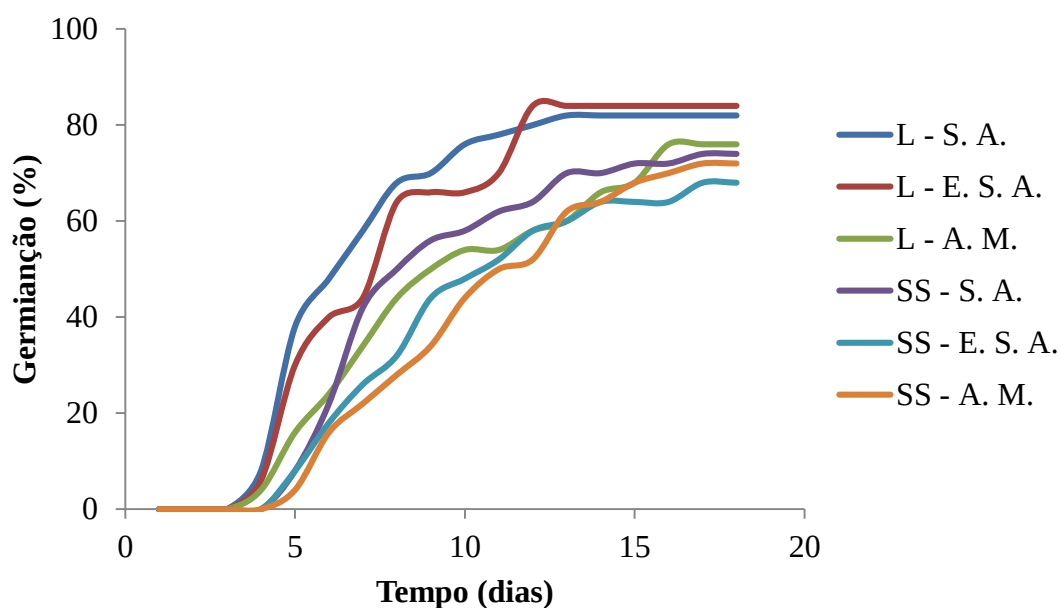


Figura 2. Curva de germinação dos seis tratamentos.

L – meio líquido; SS – meio semi-sólido; S.A. – sem utilização do antibiótico; E.S.A. - embebição de sementes no antibiótico; A.M. – antibiótico no meio.

Não houve diferença estatística em relação ao uso ou não do antibiótico no meio semi-sólido, porém o mesmo não ocorreu no meio líquido, já que ao utilizar antibiótico no meio de cultura, a média de germinação foi inferior quando comparado com demais médias (Tabela 2). Tal fato ocorreu provavelmente devido que, ao entrar em contato com o meio, alguns explantes podem ter seu desenvolvimento afetado, em virtude às restrições na velocidade de absorção dos nutrientes no meio semi-sólido, bem como o antibiótico pode ter proporcionado fitotoxidade, inibindo o desenvolvimento das sementes.

A maior média de germinação (84%) foi obtida ao utilizar meio de cultura líquido e sementes embebidas em antibiótico. No trabalho realizado por Coelho et al. (2001), com sucupira-branca, que também é uma espécie lenhosa, utilizando meio de cultura líquido, a germinação obtida foi de 95% quando se retirou o tegumento da semente e de 80 % quando o tegumento foi seccionado.

Tabela 2. Germinação das sementes de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) de acordo com tipo de meio de cultura e do uso ou não de antibiótico. SA.: Sem antibiótico; E.S.A.: Embebição de sementes no antibiótico; A.M.: Antibiótico no meio de cultura. Areia – PB, 2017.

Tipo de Meio	Germinação (%)		
	S.A.	E.S.A.	A.M.
Líquido	82 aA	84 aA	62 aB
Semi-Sólido	74 aA	68 bA	74 aA

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação aos tipos de meios, o índice de velocidade de germinação (IVG) para sementes em meio de cultura líquido foi significativo com média de 0,568, enquanto não houve diferença estatística quanto a porcentagem de oxidação, poliembrião e contaminação ao utilizar os meios líquido ou semi-sólido (Tabela 3).

Tabela 3. Índice de velocidade de germinação (IVG); porcentagem de oxidação, poliembrião e contaminação das sementes de (*Myrciaria jaboticaba*) em função dos dois tipos de meio. Areia – PB, 2017.

Tipo de meio	IVG	Oxidação (%)	Poliembrião (%)	Contaminação (%)
Líquido	0,568 a	8,0 a	18,66 a	0 a
Semi-Sólido	0,475 b	15,33 a	13,33 a	0 a

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve maior IVG de *M. jaboticaba* quando o antibiótico estava ausente no meio (S.A), mas não diferenciou quando comparado quando foi realizado a embebição das sementes com o referido produto (E.S.A), contudo teve diferença estatística quando o antibiótico foi adicionado no meio de cultura (Tabela 4). Rossa et al. (2010), ao semear sementes de jaboticaba totalmente limpas e com o endocarpo aderido, em substrato

composto por Florestal Plantmax (50% v/v) + composto orgânico peneirado (30% v/v) + vermiculita de granulometria média (20% v/v), obtiveram o IVG de 1,12 e 0,98 respectivamente. Santos et al. (2015), ao utilizar meio de cultura semi-sólido na germinação de sementes de jabuticaba Sabará obtiveram o IVG de 0,32. Vale ressaltar que, quanto maior o IVG, maior a velocidade de germinação diária.

Ao utilizar antibiótico no meio de cultura, a percentagem de oxidação foi significativa, com média de 23%. Palú et al. (2011), encontraram resultado similar, quando não utilizaram o antibiótico no meio de cultura na propagação de figueira, a percentagem de oxidação foi menor de 3,58%, mas quando utilizaram tetraciclina 500 mg L⁻¹ no meio a oxidação foi 54,42%. Segundo Azofeifa (2009), o uso do meio de cultivo líquido, de antioxidantes no meio de cultivo ou na preparação do explante, e de explante juvenil, são algumas formas para evitar a oxidação.

Não houve diferença estatística na utilização ou não do antibiótico para a presença de poliembrionia. Salla (2016), afirma que a poliembrionia está diretamente relacionada com o sistema reprodutivo apomítico. Conforme Wagner Júnior et al. (2011), a jabuticaba Sabará apresentou maior número de plântulas por sementes (1,46) em relação à jabuticaba de Cabinho (1,29).

Não houve contaminação fúngica e bacteriana, provavelmente devido à eficiência da assepsia realizada nos explantes antes e depois da embebição em todos os tratamentos, e no processo da inoculação.

Tabela 4. Índice de velocidade de germinação (IVG); percentagem de oxidação, poliembrionia e contaminação das sementes de jabuticabeira (*Myrciaria jaboticaba*) em função do uso ou não de antibiótico. S.A.= Sem utilização do antibiótico; E.S.A.= Embebição de sementes no antibiótico; A.M.= Antibiótico no meio de cultura. Areia – PB, 2017.

Uso do antibiótico	IVG	Oxidação (%)	Poliembrionia (%)	Contaminação (%)
S.A.	0,606 a	4,00 b	19,00 a	0 a
E.S.A.	0,530 ab	8,00 b	14,00 a	0 a
A.M.	0,429 b	23,00 a	15,00 a	0 a

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao tipo de meio houve significância na variável comprimento da parte aérea obtendo médias de 5,69 e 4,25 cm no meio líquido e semi-sólido, respectivamente (Tabela 5). Wagner Júnior et al. (2011), utilizando sementes de Sabará com 6mm e maior que 8mm de diâmetro, semeadas em substrato Plantmax®, obtiveram média da altura da planta de 2,18 cm e 2,73 cm, respectivamente.

Tabela 5. Número de raiz, número de folha; comprimento da maior raiz e da parte aérea; presença de ramificação das sementes de (*Myrciaria jaboticaba*) em função dos dois tipos de meio. Areia – PB, 2017.

Tipo de Meio	Nº de raiz	Nº de folhas	Comprimento de maior raiz (cm)	Comprimento da parte aérea (cm)	Presença de ramificação
Líquido	0,80 a	5,60 a	3,82 a	5,69 a	0,35 a
Semi-Sólido	0,65 a	4,72 a	3,55 a	4,25 b	0,29 a

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao número de raízes e comprimento da parte aérea, não houve diferença estatística em relação ao uso ou não do antibiótico. A mesma condição se repetiu para a presença de ramificação. Estas ramificações estão presentes no colo da plântula, dando a impressão de que é a presença da poliembrionia, sendo esta uma característica de algumas *Myrtaceae*. Quando se analisa comprimento de maior raiz, não houve diferença estatística em relação à utilização ou não do antibiótico. (Tabela 6). Maldonado (2014) obteve o tamanho das plântulas de gabirobeira cultivadas *in vitro* por 60 dias de 17,67 mm.

O número de folhas foi significativo quando não se utilizou o antibiótico, obtendo média de 6,58, e quando as sementes ficaram embebidas no antibiótico, com média de 5,64. De acordo com Wagner Júnior et al. (2011), as sementes jaboticaba Sabará classificadas entre 6-8 mm, obtiveram o número de folhas 1,78 após 46 dias de cultivo. Sasso (2009), ao utilizar caule de jabuticabeira Sabará como explante, obteve o número de folhas de 4,2. Já Maldonado (2014), obteve o número de folhas de gabirobeira cultivadas *in vitro* por 60 dias de 1,4.

Tabela 6. Número de raiz e folhas; comprimento da maior raiz e da parte aérea; presença de ramificação das sementes de (*Myrciaria jaboticaba*) em função do uso ou não de antibiótico. S.A.: Sem utilização antibiótico; E.S.A.: Embebição de sementes no antibiótico; A.M.: Antibiótico no meio de cultura. Areia – PB, 2017.

Uso do antibiótico	Nº de raiz	Nº de folhas	Comprimento de maior raiz (cm)	Comprimento da parte aérea (cm)	Presença de ramificação
S.A	0,84 a	6,58 a	4,51 a	5,58 a	0,45 a
E.S.A.	0,71 a	5,64 a	3,84 ab	5,63 a	0,30 a
A.M.	0,63 a	3,27 b	2,69 b	3,71 a	0,22 a

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Palú et al. (2011), altas concentrações de antibiótico adicionadas ao meio de cultura pode causar fitotoxicidade, sendo assim um fator limitante. Santos et al. (2005), observaram que a adição de rifampicina no meio de cultivo foi fitotóxico nas concentrações de 0,5 e 1,0 gL⁻¹. A ação fitotóxica ocorre, geralmente, devido a distúrbios da síntese proteica e da ação inibitória na síntese de ARNs e ATPs, com interferência, nos sistemas energéticos da planta (PRADO FILHO, 1975).

Na figura 3, verificam-se plântulas dos seis tratamentos aos 45 dias após a inoculação das sementes, onde a germinação e o desenvolvimento das plântulas ocorreram de forma uniforme em todos os tratamentos, obtendo-se plântulas normais e sadias, podendo ser utilizadas na etapa seguinte, do trabalho, referente aos experimentos de microenxertia.

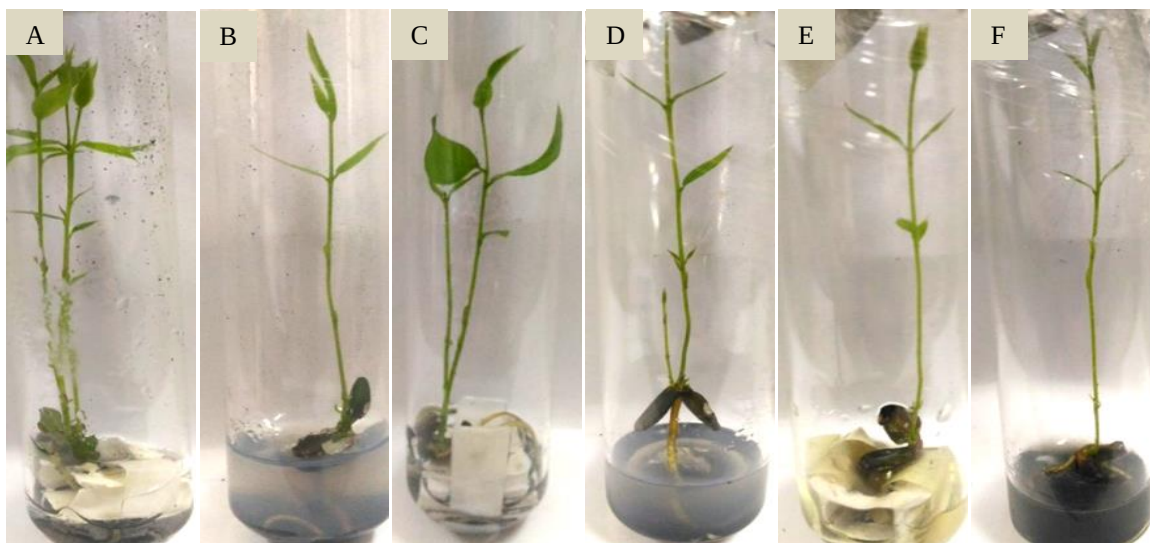


Figura 3. Plântulas de *Myrciaria jaboticaba* obtidas no cultivo *in vitro*. Meio líquido sem antibiótico (A); Meio semi-sólido sem antibiótico (B); Meio líquido, sementes embebidas no antibiótico (C); Meio semi-sólido, sementes embebida no antibiótico (D); Meio líquido com antibiótico no meio (E); Meio semi-sólido, com antibiótico no meio (F). Areia – PB, 2017.

4. CONCLUSÕES

As sementes de *Myrciaria jaboticaba* têm maior germinação e melhor desenvolvimento no meio de cultura líquido.

A germinação de *M. jaboticaba* ocorreu no quarto e quinto dia após semeadura no meio líquido e semi-sólido, respectivamente.

A não utilização do antibiótico e utilização do mesmo na embebição de *M. jaboticaba* proporciona melhores resultados.

A presença do antibiótico no meio de cultura provavelmente causa fitotoxidade, comprometendo assim a germinação e desenvolvimento das plântulas de *M. jaboticaba*, portanto seu uso diretamente no meio de cultura não é indicado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 227-230, 2006.
- AZOFEIFA, A. Problemas de oxidação e escurecimento de explantes cultivados *in vitro*. **Agronomia Mesoamericana**, San José, v. 20, n. 1, p. 153-175, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 365p, 1992.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPACNPH, 1990. p.37-69.
- CARNEIRO, J. G. A. **Produção e qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF; Campos: UNEF, 451 p. 1995.
- CHALFUN, N. N. J.; PIO, R. **Aquisição e plantio de mudas frutíferas**. Lavras: UFLA, 19 p. (Boletim Técnico, 113), 2002.
- COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R. de; CID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, p.38-48, 2001.
- COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A. A. SILVA, O. F.; PENA, R. C. M.; MAGALHÃES, F. H. L. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por semente. **Revista Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 552- 555, 2000.
- DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. In: LUZ, W. C. et al. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, RS, 2002. v.10, p. 391-407.
- DONADIO, L. C. **Jaboticaba** (*Myrciaria jaboticaba* Vell. Berg). Jaboticabal: FUNEP, 55p, 2000.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de plantas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivares MC, Adams e Portugal. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 8, n. 2, p. 107-115, 2003.
- GARCIA, L. C. Influência da temperatura na germinação de sementes e no vigor de plântulas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex-Spreng) Schum.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 7, p. 1145-1150, 1994.

GRATTAPAGLIA, D. ; MACHADO, M. A . Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa/SPI, v. 1, p. 183-260, 1998

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

MALDONADO, A. C. D. **Propagação in vitro da Gabirobeira (*Campomanesia* ssp.)**. 2014. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 1: técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biribá, carambola, cereja-do-rio-grande, jaboticaba**. Porto Alegre, Cinco Continentes. 327p, 2000.

MELO, B. PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura in vitro de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, p.1301-1306, nov. 2001.

MEXAL, J. L.; LANDIS, T. D. Target seedling concepts: height and diameter. In: TARGET SEEDLING SYMPOSIUM, MEETING OF THE WESTERN FOREST NURSERY ASSOCIATIONS, GENERAL TECHNICAL REPORT RM-200, 1990, Roseburg. **Proceedings...** Fort. Collins: USDA, Forest Service, p. 17-35. 1990.

OLIVEIRA, I. V. M; ANDRADE, R. A; MARTINS, A. B. G. Influência da temperatura na germinação de sementes de *Annona montana*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 344-345, 2005.

PALÚ, E. G.; CORRÊA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592. 2011.

PASQUAL, M. e PINTO, J. E. B. P. **Cultura de embriões**. ABCTP Notícias, v. 9, p. 2-12, 1988.

PEREIRA, G. A. **Uso do gene *xylA*– xilose isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros**. 2004, 38 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

PEREIRA, G. A.; RIBEIRO, B. V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M. B. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

PRADO FILHO, L. G. Emprego de antibióticos em agricultura. In: LACAZ, C. S. (Coord.). **Antibióticos** São Paulo: E. Blucher, 1975. p. 472-509.

PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**: 17 – High-Tech and micropropagation I. Berlin: Springer Verlag, 1991. p.168-189.

REED, B. M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: Identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 52, p. 67-70, 1998.

ROSE, R.; CARLSON, W. C.; MORGAN, P. The target seedling concept. In: TARGET SEEDLING SYMPOSIUM; MEETING OF THE WESTERN FOREST NURSERY ASSOCIATIONS, 1990, Oregon. **Proceedings...** Oregon: USDA, p. 1-9. 1990.

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* (jabuticabeira) em função de diferentes tratamentos pré-germinativos. **Floresta**, Curitiba, v. 40, n. 2, p.371-378, 2010.

SALLA, V. P. **Apomixia determinando a estrutura genética de uma população de plinia cauliflora no sudoeste do Paraná**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

SANTOS, M. H. L. C. et al. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v. 32, n. 2, p. 1-8. 2005.

SANTOS, S. K.; PEREIRA, S. S.; COSTA JÚNIOR, O. D.; SANTOS, L. A.; COSTA, N. P. . **Germinação in vitro de jabuticabeira** (*Myrciaria jaboticaba*). In: 20º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e 7º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2015.

SASSO, S. A. Z. **Propagação vegetativa de jabuticabeira**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2009.

SCORTICHINI, M.; CHIARIOTTI, A. *In vitro* culture of *Prunus persica* var. *laevis* gray (Nectarine): detection of bacterial contaminants and possibility of decontamination by means of antibiotics. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 225, p. 109-118, 1988.

SILVA, J. T. S.; NHUT, D. T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 97, p. 397-410, 2003.

SILVA, P. C.; DIAS, J. M. M.; NEVES, J. C. L.; SALOMÃO, L. C. S.; COUCEIRO, M. A.; ROCHA, M. A. **Protocolo para desinfestação de sementes de tangerineira Cleópatra** (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). 2005. Disponível em <http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/317.htm> Acesso em: 10 jun 2017.

SOUZA, A. S.; T. L.; JUNGHANS. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. 152 p.

WAGNER JÚNIOR, A. FRANZON, R. C.; SILVA, J. O. C.; SANTOS, C. E. M.; GONÇALVES, R. S.; BRUCKNER, C. H. Efeito da temperatura na germinação de sementes de três espécies de jabuticabeira. **Revista Ceres**, [S. L.], v. 54, p.345-350, 2007.

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. Agronomy**, Maringá, v. 33, p.105-109, 2011.

**CAPÍTULO 2: MICROENXERTIA *IN VITRO* DE JABUTICABEIRA *Myrciaria*
jaboticaba (VELL.) BERG**

**CHAPTER 2: MICROENXERTIA *IN VITRO* DE JABUTICABEIRA *Myrciaria*
jaboticaba (VELL.) BERG**

RESUMO

A técnica da microenxertia vem crescendo no cultivo *in vitro* de plantas e visa à obtenção de plantas livres de patógenos, com qualidades genéticas superior e com menor tempo de juvenilidade, já que ao realizar este procedimento, o ramo ou estaca usado como porta-enxerto será retirado de uma planta adulta e que geralmente manterá essa característica. Com isto, o presente trabalho teve como objetivo obter a microenxertia *in vitro* da jaboticabeira (*Myrciaria jaboticaba*). O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba (LABCULTIVE/CCA/UFPB). O processo de microenxertia foi realizado, tendo como porta-enxerto as plântulas que se desenvolveram *in vitro* e como enxerto estacas provenientes de plantas cultivadas *in vitro* e de planta matriz proveniente de cultivo no campo. As estacas provenientes do campo foram utilizadas sem e com ação de antibiótico por 24 horas, através de embebição. Todas as estacas continham um par de gemas axilares. Avaliou-se a percentagem de pegamento, contaminação e mortalidade dos microenxertos. A maior porcentagem de pegamento foi obtida quando se utilizou enxerto e porta-enxerto do cultivo *in vitro* (75%), e a maior percentagem de contaminação foi obtida quando os enxertos utilizados foram estacas de uma planta matriz, sem utilização de antibiótico (80%). Conforme os dados, conclui-se que a maior porcentagem de pegamento dos microenxertos foi obtida quando se usou o porta-enxerto e enxerto provenientes do *in vitro*; o antibiótico não é eficiente na eliminação de microrganismos das estacas vindas de planta em condições do campo.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, Enxertia, Micropropagação

ABSTRACT

The technique of micro grafting has been increasing in the *in vitro* cultivation of plants and aims to obtain plants free of pathogens, with superior genetic qualities and with less time of juvenility, since in performing this procedure, the branch or cuttings used as a rootstock will be removed from an adult plant and will generally maintain its characteristic. Based on that, the aim of this work was to obtain the *in vitro* micro grafting of the jaboticabeira (*Myrciaria jaboticaba*). The experiment was carried out at Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais, in the Centro de Ciências Agrárias, of the Universidade Federal da Paraíba (LABCULTIVE/CCA/UFPB). The microenxertia process was carried out, having as rootstock seedlings that were developed *in vitro* and as grafting cuttings from plants grown *in vitro* and from a plant from the field. The cuttings from the field were used without and with antibiotic action for 24 hours through imbibition. All the rootstocks contained a pair of axillary gems. The percentage of survival, contamination and mortality of micrografts was evaluated. The highest percentage of survival was obtained when *in vitro* grafting and rootstock was used (75%), and the highest percentage of contamination was obtained when the grafts used were cuttings of a parent plant, without the use of antibiotics (80%). According to the data, it was concluded that the highest percentage of micro grafting survival was obtained when using the *in vitro* rootstock and graft; The antibiotic was not efficient in the elimination of microorganisms from the cuttings coming from plant under field conditions.

Key words: *In vitro* culture, grafting, Micropropagation

1. INTRODUÇÃO

Uma característica considerada limitante para a cultura de jabuticabeiras é o seu longo período juvenil, sendo necessário, portanto, produzir bons porta-enxertos de mudas e enxertar as variedades desejadas, ou ainda se multiplicando por outros processos vegetativos (ANDRADE & MARTINS, 2003). Na tentativa de diminuição desta longa juvenilidade, técnicas estão sendo desenvolvidas e aprimoradas. Uma dessas técnicas é a microenxertia, que juntamente com a micropropagação, pode auxiliar a produção de mudas de alto padrão genético e uniformes em curto espaço de tempo, em qualquer época do ano.

A microenxertia *in vitro* foi proposta a primeira vez por Murashige et al. (1972), na tentativa de superar a dificuldade de regeneração a partir de ápices caulinares em citrus no processo de limpeza clonal. Atualmente esta técnica é também utilizada para a obtenção de plantas livres de viroses (PAZ & PASQUAL, 1998; PASQUAL, 2001), o que possibilita a produção de matrizes de fruteiras com alta qualidade fitossanitária e com características adultas (PAZ & PASQUAL, 1998). De acordo com Hartmann et al. (1997), a microenxertia é também uma técnica promissora para detecção precoce de reação de incompatibilidade entre as duas partes enxertadas.

Para Murashige et al. (1972), a técnica de microenxertia baseia-se em enxertar um pequeno segmento terminal (meristema) da planta que se deseja livrar de um vírus, em um micro-porta-enxerto, obtido a partir de sementes germinadas no escuro. Já para Grattapaglia & Machado (1998), microenxertia consiste em enxertar um meristema, oriundo de uma planta-matriz, sobre um porta-enxerto multiplicado *in vitro*.

O primeiro estágio da união ocorre em poucos dias, sendo caracterizado, portanto, pela morte de camadas celulares da interface do enxerto e pela formação de células parenquimáticas (ABREU et al., 2003). Segundo Jeffree & Yeoman (1983), a diferenciação de algumas células do calo, a partir de novas células cambiais, forma uma união entre os tecidos afins da copa e do porta-enxerto, resultando no estabelecimento de uma conexão cambial contínua, na qual o posterior desenvolvimento da copa pelo alongamento e formação de novas camadas celulares, assegurará o estabelecimento da continuidade da vascularização entre o porta-enxerto e a copa.

Abreu et al. (2003), descreveram as características histológicas do processo de soldadura entre plantas de macieira micropropagadas e microenxertadas, onde 30 dias após análise do material, ocorreu a soldadura parcial dos microenxertos, sendo necessário maior

tempo para verificar se houve conexão cambial dos mesmos. Biricolti & Chiari (1994), ao utilizar ápices caulinares com 0,2 a 0,4 mm de comprimento, com no máximo quatro primórdios foliares, coletados de plantas de *P. edulis* não obtiveram regeneração no cultivo *in vitro*, apesar da sobrevivência dos explantes por longo período, porém ao utilizar a microenxertia, esses autores obtiveram 50% de pegamento.

Singh et al. (2008), trabalhando com microenxertia em citrus, verificaram que o processo de oxidação prejudicou o pegamento dos enxertos, recomendando, portanto, o uso de uma solução antioxidante para mergulhar o explante, ou aplicar uma gota do antioxidante sobre o porta-enxerto, imediatamente antes de colocar o cavaleiro. Santos et al. (2015), ao realizarem trabalho sobre microenxertia *in vitro* de jaboticabeira, não obtiveram sucesso quanto ao pegamento devido o alto índice de contaminação, que ocorreu em todos microenxertos.

A manipulação das partes vegetais a serem microenxertadas é bastante cautelosa devido à fragilidade que esse material apresenta, portanto, é de grande importância a utilização de materiais apropriadamente desinfetados, e que a pessoa seja preparada para que possa obter índices de pegamento e compatibilidade satisfatórios. De acordo com Carvalho & Paiva (1993), o manejo das plântulas durante a microenxertia é bastante difícil, requerendo materiais especiais como lupas, bisturis, pinças em condições assépticas e que o operador seja treinado. Para Prakash et al. (1999), esta técnica possibilita a detecção precoce de incompatibilidade de espécies. Dickison (2000), afirma que o processo de soldadura dos microenxertos é condicionado fundamentalmente pela congenialidade dos indivíduos.

É necessário que o material utilizado como enxerto esteja livre de patógenos, seja oriundo de uma planta matriz sadia e com boas características genéticas, evitando assim, contaminações e proporcionando maior índice de pegamento e desenvolvimento dos microenxertos.

O presente trabalho teve como objetivo obter a microenxertia *in vitro* da jaboticabeira *M. jaboticaba*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos Microenxertos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais (LABCULTIVE), no Departamento de Ciências Biológicas (DCB), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

As plântulas de jabuticabeira que se desenvolveram após a germinação das sementes cultivadas *in vitro*, em meio de cultura líquido e semi-sólido, foram transferidas na capela de fluxo laminar, quando tinham entre 5 a 13 cm de altura, para potes contendo meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), na qual o pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de 7,0 g/L⁻¹ do ágar e de 2,0 de carvão ativado. Em seguida, os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C e 1,5 atm, por 20 minutos. Após a inoculação as plântulas permaneceram em sala de crescimento, na presença de luz com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2 °C.

Após transferência e desenvolvimento das plântulas, quando houve compatibilidade no diâmetro do caule, entre o porta-enxerto e o material vegetal que foi utilizado como enxerto, foi testado a microenxertia.

2.2. Tratamentos

Os tratamentos se constituíram fontes de porta-enxerto a ser utilizado na microenxertia que possibilitasse o maior percentual de pegamento.

2.2.1. Tratamento 1 – Estacas de uma planta matriz diretamente do campo

Os ramos que vieram de uma planta matriz do campo foram lavados em água corrente, divididos em estacas de 3 cm que continham um par de folhas. De cada estaca foram retiradas 2/3 do tamanho de cada folha (Figura 4). Em seguida as estacas passaram pelo processo de desinfestação, sendo lavadas três vezes com água destilada autoclavada, imersas em álcool 70% agitado por 30 segundos, lavadas por três vezes em água destilada autoclavada, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5%v/v), nesta última, houve agitação mecânica por 20 minutos. Em seguida este material foi

encaminhado para capela de fluxo laminar, onde foi lavado por mais 3 vezes com água destilada autoclavada. Cada estaca continha um par de gemas laterais.

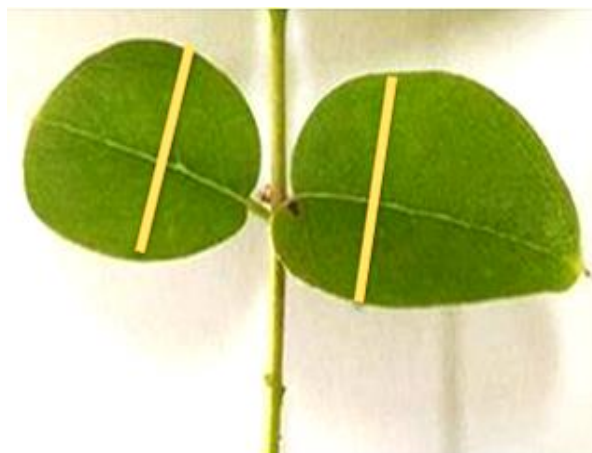


Figura 4. Esquema do corte das estacas da planta do campo e das folhas. Areia – PB, 2017.

2.2.2. Tratamento 2 – Estacas de planta do campo tratadas com antibiótico

Os ramos que vieram de uma planta matriz do campo foram lavadas em água corrente, divididos em estacas de 3 cm que continham um par de folhas. De cada estaca foram retiradas 2/3 do tamanho de cada folha. Em seguida ficaram sob ação de uma cápsula de antibiótico amoxicilina 500 mgL⁻¹ por 24 horas, para que apenas após esta embebição passassem pelo processo de desinfestação descrito no tratamento anterior. Posteriormente foram colocadas em tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura descrito no item 2.1., por um período de sete dias de quarentena com a finalidade de eliminar os que desenvolvessem fungos e/ou bactérias, para que não viessem a comprometer a sanidade dos microenxertos. Cada estaca continha um par de gemas laterais.

2.2.3. Tratamento 3 – Estacas de plantas cultivadas *in vitro*

Foram utilizadas estacas de 3 cm de plântulas cultivadas *in vitro*, em meio de cultura ½MS líquido (sem ágar) e semi-sólido (com ágar). Cada estaca continha um par de gemas laterais.

2.3. Processo de Microenxertia

Na realização da microenxertia fez-se um corte abaixo do último par de folhas do porta-enxerto e em seguida foi feito um corte em “T”. No enxerto proveniente de planta do campo foram eliminados os restos de folhas e as partes necrosadas e no enxerto de plântulas cultivadas *in vitro* foram eliminadas as folhas. Posteriormente em ambos os tipos de enxerto foram feitos cortes em bisel, assim pôde ser conectado uma estrutura na outra (Figura 5). As estruturas microenxertadas foram colocadas em meio de cultura semi-sólido de acordo com a metodologia descrita no item 2.1., e seguiram para sala de crescimento na presença de luz, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

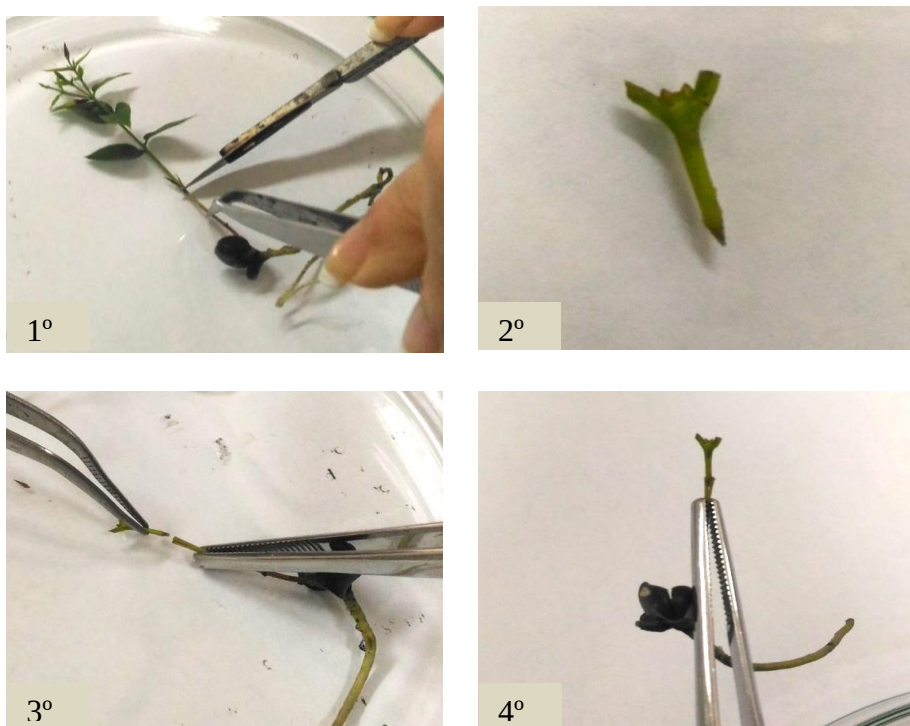


Figura 5. Sequência do processo da microenxertia. Areia – PB, 2017.

2.4. Delineamento Experimental

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 3 tratamentos com 20 repetições cada tratamento.

No presente estudo foi avaliado a espécie *M. jaboticaba* quanto a contaminação e o pegamento dos microenxertos, bem como o desenvolvimento dos mesmos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estacas provenientes de uma planta do campo tratadas com o antibiótico amoxicilina, não foram utilizadas no processo de microenxertia devido à contaminação presente em todas. Segundo Coutinho (2006), tanto ramos, como meristemas apicais utilizados na microenxertia podem ser obtidos de gemas apicais ou axilares de ramos crescendo ativamente em casa de vegetação, do campo ou removidos de ramos crescendo *in vitro*.

Visualmente a densidade de patógenos foi menor nas estacas tratadas com antibiótico, quando comparado com a densidade encontrada nas estacas, em que não se fez uso do antibiótico, utilizadas no processo de microenxertia (Figura 6). Provavelmente um maior tempo de exposição das estacas ao antibiótico, possa controlar o surgimento de bactérias. Por isto são necessários estudos mais aprofundados para o desenvolvimento de um protocolo de microenxertia de jabuticabeira.

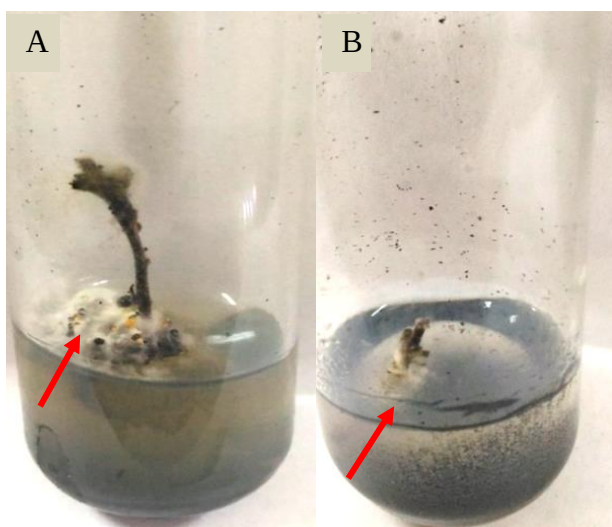


Figura 6. Comparação da contaminação presente no microenxerto (A) e na estaca colocada diretamente no meio de cultura passado os sete dias de quarentena (B). Areia – PB, 2017.

Em termos percentuais a realização da microenxertia utilizando o enxerto e o porta enxerto do cultivo *in vitro*, mostrou-se mais eficiente quando comparado a utilização do

enxerto proveniente de uma planta matriz do campo, atingindo ao final de quatro semanas 75% e 5% dos microenxertos com pegamento e livre de contaminação, respectivamente (Figura 7).

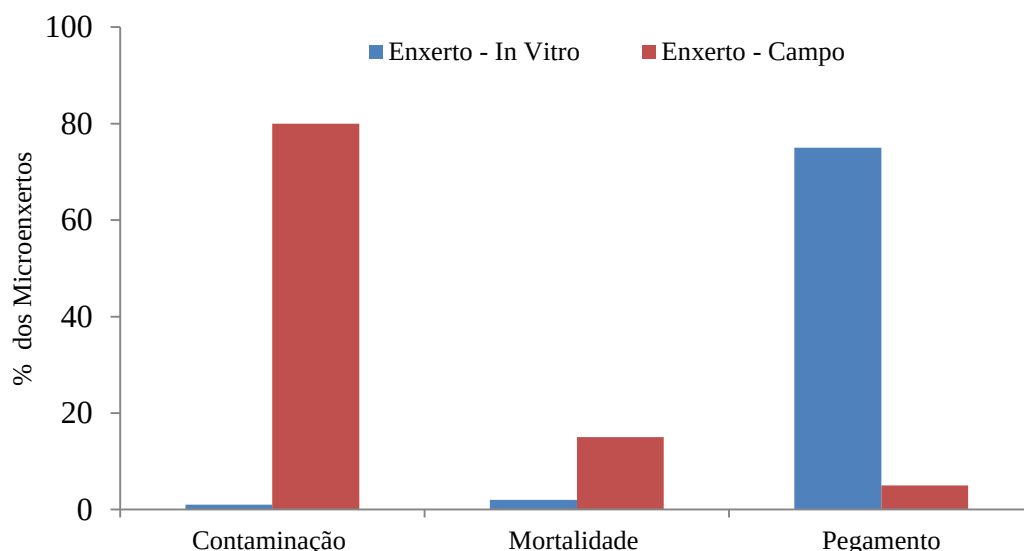


Figura 7. Percentagem de contaminação, mortalidade e pegamento dos microenxertos de *Myrciaria jaboticaba*. Areia – PB, 2017.

Um dos maiores problemas encontrados no estabelecimento *in vitro* são as contaminações no interior dos tecidos, conhecida como contaminação endógena, mais frequentemente encontradas em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (MALDONADO, 2014). Santos et al. (2015), ao utilizar estacas de uma planta matriz do campo para a realização de microenxertia, não obtiveram sucesso, pois houve contaminação em todos os microenxertos.

Coutinho (2006), ao realizar a microenxertia de tomateiro (enxerto) e jurubebeira (porta-enxerto), ambos cultivados *in vitro*, o pegamento foi de 50% após a quarta semana quando o corte foi T-invertido, já quando o corte foi em bisel, não houve pegamento. Em citrus, a microenxertia com brotações regeneradas *in vitro* apresenta 100% de pegamento (SILVA et al., 2005).

A mortalidade dos microenxertos da jaboticabeira foi caracterizado pelo escurecimento dos mesmos (Figura 8). Segundo Coutinho (2006), o escurecimento do

tecido é comumente resultado da morte de enxertos muito pequenos, podendo ser reduzidos mergulhando rapidamente o explante em solução antioxidante.



Figura 8. Escurecimento caracterizando a morte dos microenxertos *Myrciaria jaboticaba*. Areia - PB, 2017.

Na figura 9 pode-se verificar o pegamento dos microenxertos de *M. jaboticaba*, tendo como enxerto estacas de plântulas cultivadas *in vitro* e de uma planta matriz do campo.

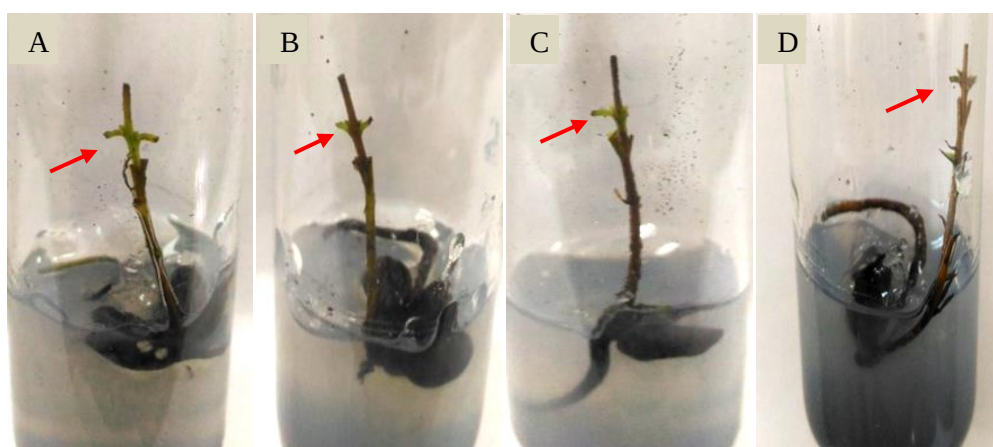


Figura 9. Pegamento dos microenxertos, evidenciado pela coloração esverdeada. Enxerto proveniente de plântulas cultivadas *in vitro* (A, B, C) e enxerto proveniente de planta em condições do campo (D), Areia – PB, 2017.

Além das condições assépticas, a compatibilidade do diâmetro do porta-enxerto com o enxerto do material vegetal cultivado *in vitro*, foi maior. Este é um fator relevante que interfere diretamente no pegamento dos microenxertos, já que é necessário haver conexão dos vasos condutores para desenvolvimento dos mesmos.

Contudo, é preciso estabelecer *in vitro* ramos e/ou estacas de planta proveniente do campo, para que a realização do processo de microenxertia seja livre de patógenos e com alto percentual de pegamento. No entanto, é de grande valia estudos mais aprofundados.

4. CONCLUSÕES

A utilização de porta-enxerto e enxerto de *Myrciaria jaboticaba* proveniente de cultivo *in vitro* proporciona 75% de estabelecimento inicial dos microenxertos.

A presença de contaminantes compromete o desenvolvimento dos microenxertos *M. jaboticaba* quando se empregou enxerto de plantas provenientes de cultivo em campo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advances in Horticultural Science**, v. 8, p. 171-175, 1994.
- CARVALHO, DE S. A.; PAIVA, L. V. Alternativa para promoção do crescimento *in vitro* de microenxertos de citrus. **Revista Agropecuária Brasileira**, Lavras, v. 28, n. 9, p.1095-1099, 1993.
- COUTINHO, O. L. **Desenvolvimento de protocolo para microenxertia do tomateiro *Lycopersicon esculentum* Mill.** 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2006.
- DICKISON, W.C. **Integrative plant anatomy.**: Hartcourt: Academy Press, 2000. 533p.
- HARTMANN, H. T. KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. Principles of tissue culture for micropropagation. In: _____. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p. 549-589.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, 1998. p. 183-260.
- JEFFREE, C. E.; YEOMAN, M. M. Development of intercellular connections between opposing cells in graft unions. **New Phytologist**, New York, v. 93, n. 4, p. 491-509, 1983.
- MALDONADO, A. C. D. **Propagação in vitro da Gabirobeira (*Campomanesia* ssp.)**. 2014. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P. RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting an its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. **Hortscience**, Alexandria, v. 7, p. 118 – 119, 1972.
- PASQUAL, M. Introdução: fundamentos básicos. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologias e aplicações**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p.
- PAZ, O. P.; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A. C. CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, p. 147-160.
- PRAKASH, O.; SOOD, A.; SHARMA, M.; AHUJA, P. S. Grafting micropropagated tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] shoots on tea seedlings – a new approach to tea propagation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, p. 883-888, 1999.

SANTOS, S. K.; PEREIRA, S. S.; COSTA JÚNIOR, O. D.; SANTOS, L. A.; COSTA, N. P. **Germinação In Vitro De Jaboticabeira** (*Myrciaria jaboticaba*). In: 20º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e 7º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2015.

SILVA, R. P.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; ALMEIDA, W. A. B. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 12, p. 1153-1159, 2005.