

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS E PROPAGAÇÃO VEGETATIVA
DE GUABIJUZEIRO (*Myrcianthes pungens* (O.BERG) D.
LEGRAND)

Luana dos Santos de Souza
Bióloga (ULBRA)

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase em Horticultura

Porto Alegre, RS, Brasil
Abril de 2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por cada realização de sonhos.

A minha família e principalmente ao meu marido Jayme Eduardo por todo o apoio e compreensão proporcionados nas horas mais difíceis.

Ao professor Sergio Francisco Schwarz pela orientação, amizade, carinho, dedicação e apoio em todas as etapas deste trabalho.

Ao professor Paulo Vitor Dutra de Souza pelo apoio, contribuições e sugestões.

Ao meu amigo e colega Claudimar Sidnei Fior, pela amizade, orientação técnica e por muito contribuir na realização e conclusão deste trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Agronomia da UFRGS Idenir, Ernani, Arlindo, ao estagiário William pelo apoio na condução de trabalhos.

Aos colegas, que percorreram comigo essa batalha, principalmente as colegas e amigas Daiane, Vanessa, Monica, Cândida e Precila.

Aos meus amigos, por sempre estarem ao meu lado, me mostrando o verdadeiro valor de uma amizade.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Fitotecnia da UFRGS, pelos conhecimentos transmitidos e pela cooperação.

Aos coordenadores do curso de pós-graduação, pela oportunidade.

Aos funcionários da FEPAGRO Bruno e Rodrigo pela atenção.

Ao Sr. Eliseu Rosa (tio Juca) pela troca de experiências.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma, para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

CARACTERIZAÇÃO DE FRUTOS E PROPAGAÇÃO DE GUABIJUZEIRO (*Myrcianthes pungens* (O.BERG) D. LEGRAND)¹

Autora: Luana dos Santos de Souza
Orientador: Sergio Francisco Schwarz

RESUMO

O guabijuzeiro é uma árvore perenifólia de 15 a 25 metros de altura, produtora de frutos comestíveis. Ocorre no Brasil desde São Paulo até o Rio Grande do Sul. A propagação do guabijuzeiro é realizada por sementes e são escassas as informações sobre a propagação vegetativa desta espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade dos frutos e estudar métodos de propagação. Frutos maduros, coletados em três locais: Porto Alegre (2) e Maquiné (1) foram avaliados quanto ao teor de sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT), teor de vitamina C, pH e o diâmetro dos frutos. A propagação vegetativa foi estudada através das técnicas de estaquia (tratamentos: AIB a 0, 2, 4, 6 g.L⁻¹ e vitamina C a 3 g.L⁻¹), enxertia (tratamentos: idades e diâmetros de portas-enxertos) e micropropagação (tratamentos: desinfestação de sementes com hipoclorito de sódio a 0, 2, 4, 6 e 8% por vinte minutos; testes de multiplicação em meio WPM com BAP, BAP+ANA, BAP+GA₃+ANA ou sem fitorregulador e teste de enraizamento em meio WPM com diferentes concentrações de ANA e AIB: 0,2; 0,4 e 0,6 mg.L⁻¹). Os frutos das três localidades apresentaram resultados distintos em alguns parâmetros analisados, o SST da polpa variou de 8,9 a 23,6 %, da casca ficou entre 4,6 a 9,3 %, a ATT da polpa variou de 0,07 a 0,19, e da casca de 0,14 a 0,27. Já o SST/ATT da polpa variou de 109 a 127 e da casca 33 a 56, o pH da polpa e da casca ficaram em torno de 4,7. Apenas os frutos de uma localidade apresentaram valores de vitamina C (13,67 mg/100g de polpa). Os diâmetros variaram de 15,71 a 19,38 mm. A propagação vegetativa pelos métodos utilizados é viável necessitando ampliar os estudos. A estaquia foi viável quando utilizadas estacas apicais com quatro folhas cultivadas em fevereiro, sem a utilização de AIB, em condição de nebulização intermitente. A enxertia de garfagem tipo fenda cheia em enxerto e porta-enxerto de guabijuzeiro com textura do caule lenhosa apresentaram maior eficiência. Na micropropagação o hipoclorito de sódio na concentração de 4% por vinte minutos é eficiente para desinfestação das sementes, na fase de multiplicação e enraizamento o BAP e ANA respectivamente, se mostraram mais eficientes.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (98p.) Abril, 2010.

CHARACTERIZATION OF FRUITS AND PROPAGATION OF GUABIJUZEIRO (*Myrcianthes pungens* (O. BERG) D. LEGRAND)¹

Author: Luana dos Santos de Souza
Adviser: Sergio Francisco Schwarz

ABSTRACT

The guabijuzeiro is a tree that comes from a dense, thick and compact forest; that is always green and measures from 15 to 25 meters of height, which produces eatable fruits. Its production takes place in Brazil, coming from the states of São Paulo up to Rio Grande do Sul. The propagation of the guabijuzeiro happens through seeds, and the information of these vegetative propagation are uncommon. This kind of vegetative fruit is rare. The purpose of this essay was to evaluate the quality of its fruit and study the methods of vegetative propagation. Mature fruit, collected from three different places: Porto Alegre (2) and Maquiné (1); they were evaluated as to the quantity of the total dissoluble solids (TDS), entitled total acidity (ETA), quantity of vitamin C, pH and the diameters of the fruit. The vegetative propagation was studied through the techniques of pile driving, which consists on the plantation of small stakes of the plant stalk (treatments: concentrations of BAP 0, 2, 4, 6 g.L⁻¹ and vitamin C 3 g.L⁻¹), grafting (treatments: disinfection of the peeds with chlorine bleaching lye on the following concentrations (0, 2, 4, 6 and 8% during 20 minutes, tests of environmental multiplication WPM with BAP, BAP+NAA, BAP+GA₃+NAA or without aim regulator, rooting test in WPM environmental with different concentrations 0,2; 0,4; e 0,6 mg. L⁻¹). The fruits from the three settlements presented distinct results in some analysed parameters, the TDS of the pulp had a variation of 8,9 to 23,6%, the skin showed a variation between 4,6 to 9,3%, the ETA of the pulp changed from 0,07 to 0,19, and of the skin changed to 0,14 to 0,27. At the some time, the TDS/ETA of the pulp changed from 109 to 127 and of the skin from 33 to 56, the pH of the pulp and the skin stayed ground 4,7. The fruit of only one locality showed values of vitamin C (13,67mg/100g of pulp). The diameters were assorted, from 15,71 to 19,38mm. The vegetative propagation by the used methods are possible, needing to amplify the studies. When the propagation is through the technique of cutting, it was feasible when used apical cuttings with four leaves grown in February without the use of IBA, on condition of intermittent mist. The grafting of grafting type cleft in the graft and rootstock of guabijuzeiro textured woody stem showed greater efficiency. In micropropagation sodium hypochlorite at a concentration of 4% for twenty minutes is effective for seed disinfestation, during multiplication and rooting, the BAP and NAA, respectively, showed more efficiency.

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (98p.) April, 2010.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 Descrições da espécie.....	04
2.2 Frutíferas nativas e a qualidade de seus frutos.....	08
2.3 Métodos de propagação.....	10
2.3.1 Propagação sexuada.....	10
2.3.2 Propagação vegetativa.....	11
2.3.2.1 Estaquia.....	12
2.3.2.2 Enxertia.....	13
2.3.2.3 Micropropagação.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Análises físico-química de frutos de guabijuzeiro.....	20
3.2 Propagação vegetativa.....	24
3.2.1 Propagação de guabijuzeiro por estaquia.....	24
3.2.2 Propagação de guabijuzeiro por enxertia de garfagem..	28
3.2.3 Micropropagação.....	30
3.2.3.1 Experimento 1 - Efeito do hipoclorito de sódio no estabelecimento <i>in vitro</i> de guabijuzeiro.....	31
3.2.3.2 Experimento 2: Efeito do BAP na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos apicais de plântulas de guabijuzeiro.....	33
3.2.3.3 Multiplicação de segmentos nodais e apicais de plântulas de guabijuzeiro.....	34
a) Experimento 3.....	34
b) Experimento 4: 1º subcultivo.....	35
c) Experimento 5: 2º subcultivo.....	35
3.2.3.4 Experimento 6 - Efeito do AIB e ANA no enraizamento <i>in vitro</i> de guabijuzeiro.....	36
3.3 Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Análises físico-química de frutos de guabijuzeiro.....	39
4.2 Propagação vegetativa.....	44
4.2.1 Propagação de guabijuzeiro por estaquia.....	44
4.2.2 Propagação de guabijuzeiro por enxertia de garfagem.....	53
4.2.3 Micropropagação.....	58
4.2.3.1 Experimento 1 - Efeito do hipoclorito de sódio no estabelecimento <i>in vitro</i> de guabijuzeiro.....	58

	Página
4.2.3.2 Experimento 2: Efeito do BAP na multiplicação <i>in vitro</i> de segmentos apicais de plântulas de Guabijuzeiro.....	62
4.2.3.3 Multiplicação de segmentos nodais e apicais de plântulas de guabijuzeiro.....	66
a) Experimento 3.....	66
b) Experimento 4: 1° subcultivo.....	69
c) Experimento 5: 2° subcultivo.....	73
4.2.3.4 Experimento 6 - Efeito do AIB e ANA no enraizamento <i>in vitro</i> de guabijuzeiro.....	77
5. CONCLUSÕES.....	83
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
8. APÊNDICE.....	98

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Características físico- químicas de frutos de guabijuzeiro, de três locais de coleta. Acidez total titulável (ATT), sólidos solúveis totais (SST), relação entre e SST e ATT (SST/ATT), pH da polpa e da casca (pH), vitamina C (AA) da polpa e diâmetro dos frutos. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	40
2. Porcentagem de retenção foliar, calos, raízes e número médio de raízes por estacas apicais de guabijuzeiro em diferentes concentrações de AIB, cultivadas em duas épocas do ano (fevereiro e outubro). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	46
3. Porcentagem de enxertos viáveis (ou pegamento) e número de brotações por enxerto em porta-enxertos de guabijuzeiro com diâmetros diferentes (Pequeno, Médio e Grande). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	56
4. Porcentagem de contaminação, germinação e vigor calculado pelo tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVGM) de sementes de guabijuzeiro logo após a coleta e semeadas em meio de cultura WPM. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	59
5. Porcentagem de brotação e oxidação de explantes, número médio de folhas, altura e número de brotações por explante de guabijuzeiro cultivados em meio de cultura WPM com sete concentrações de BAP (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 e 2 mg.L ⁻¹) e Testemunha (sem adição de BAP). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	63
6. Desenvolvimento de explantes apicais e nodais de guabijuzeiro, na fase de multiplicação, após 30 dias em meio WPM acrescidos com BAP (0,4 mg L ⁻¹), BAP+ANA (0,4+0,04 mg L ⁻¹) e Testemunha (sem adição de fitorregulador). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	67
7. Porcentagem de sobrevivência, oxidação e média do número de folhas das brotações emitidas pelos segmentos apicais e nodais de guabijuzeiro, na fase de multiplicação, após 30 dias em meio WPM acrescidos com BAP (0,6 mg.L ⁻¹), BAP+ANA (0,4+0,04 mg.L ⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	70

8. Número de brotações por explante, número de folhas e altura das brotações (cm) de guabijuzeiro do 2º subcultivo utilizando como explantes segmentos apicais e nodais de guabijuzeiro, em meio WPM acrescidos com BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$), 3 FIT ($0,03 \text{ BAP} + 0,2 \text{ ANA} + 0,3 \text{ GA}_3 \text{ mg.L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009. segmentos apicais e nodais de guabijuzeiro, em meio WPM acrescidos com BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$), 3 FIT ($0,03 \text{ BAP} + 0,2 \text{ ANA} + 0,3 \text{ GA}_3 \text{ mg.L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009..... 77
9. Porcentagem de explantes de guabijuzeiro vivos, com calos e com raízes após 45 dias de inoculação em meios com ANA (0,2; 0,4 e $0,6 \text{ mg. L}^{-1}$) e AIB (0,2; 0,4 e $0,6 \text{ mg. L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009..... 78
10. Porcentagem explantes de guabijuzeiro vivos, com calos e com raízes após 45 dias de inoculação em meios com diferentes concentrações de ANA (0,2; 0,4 e $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009..... 80
11. Porcentagem de explantes de guabijuzeiro vivos, com calos e com raízes após 45 dias de inoculação em meios com diferentes concentrações de AIB (0,2; 0,4 e $0,6 \text{ mg. L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009..... 81

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. <i>Myrcianthes pungens</i> , (A) planta adulta (Foto de Claudimar Sidnei Fior); (B) Folhas com ápice cuspidado pungente (espinhoso); (C) Floração (Foto do livro árvores do Sul, Backes & Irgang 2002); (D e E) Frutos; (F) Sementes. Porto Alegre, RS, 2009.....	06
2. Diâmetro de fruto de guabijuzeiro medido com auxílio de um paquímetro digital, os frutos maduros tiveram seu diâmetro medido na parte intermediária com o cálice voltado para cima. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	21
3. (A) Árvore adulta de guabijuzeiro – FEPAGRO, Viamão; (B) estaca apical com aproximadamente 6 cm de comprimento com quatro folhas - UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	25
4. Detalhe do corte realizado em ambos os lados na base da estaca de guabijuzeiro com aproximadamente 1,5cm, expondo o câmbio vascular. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	26
5. Estacas apicais de guabijuzeiro estabelecidas em bandejas multicelulares para enraizamento em substrato contendo casca de arroz carbonizada e vermiculita (1:1 v/v), em casa de vegetação com nebulização intermitente. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	27
6. (A) Garfos de guabijuzeiro com caule semilenhoso enxertados em porta- enxertos de guabijuzeiro cobertos com parafilme; (B) Garfos de guabijuzeiro com caule lenhoso enxertados em porta- enxertos de guabijuzeiro cobertos com um saco plástico transparente. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	30
7. (A) Plântula de guabijuzeiro obtida <i>in vitro</i> em meio WPM com 90 dias de idade após a inoculação da semente; (B) Detalhe do segmento apical de plântula de guabijuzeiro; (C) Segmentos apicais de plântulas de guabijuzeiro inoculados em meio WPM. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	33
8. Propagação <i>in vitro</i> de guabijuzeiro: Brotações com diferentes alturas (entre 0,6 e 2,5cm) obtidas em meio WPM acrescentado de BAP (0,6 mg.L ⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	37

	Página
9. Diferentes tamanhos de frutos de guabijuzeiro proveniente de uma planta localizada em Porto Alegre (PoA1). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	43
10. Estacas de guabijuzeiro enraizadas após 120 dias, coletadas em fevereiro de 2009, na FEPAGRO em Viamão, RS. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	45
11. Estacas de guabijuzeiro enraizadas após 120 dias, coletadas em outubro de 2009, na FEPAGRO em Viamão, RS. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	46
12. Médias de temperatura máximas e mínimas da casa de vegetação com nebulização intermitente. (A) fevereiro/2009 (B) outubro/2009. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	48
13. Médias de umidade relativa do ar da casa de vegetação com nebulização intermitente nos meses de fevereiro a maio de 2009. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	50
14. Estacas de guabijuzeiro após 120 dias, com calos de diferentes tamanhos na base. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	51
15. (A) Mudas de estacas de guabijuzeiro coletadas em fevereiro de 2009, com brotações após dez meses; (B) Detalhe da muda com brotações após dez meses provenientes do experimento realizado em fevereiro de 2009. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	53
16. (A) Início das brotações após trinta dias da enxertia em enxerto e porta-enxerto de guabijuzeiro, com textura do caule lenhoso; (B) detalhe das brotações de guabijuzeiro após 45 dias da enxertia. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	53
17. Porcentagem de enxertos viáveis após enxertia de garfagem em porta-enxerto de guabijuzeiro com idades diferentes. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	54
18. Sementes de guabijuzeiro contaminadas por microrganismos, inoculadas <i>in vitro</i> em meio WPM sem fitoreguladores. (tratamento: 0% de hipoclorito de sódio). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	59
19. Germinação <i>in vitro</i> de sementes de guabijuzeiro tratadas com hipoclorito de sódio inoculadas em meio WPM. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	60
20. Porcentagem de germinação de sementes de guabijuzeiro em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Porto Alegre, RS, 2009.....	62

	Página
21. Desenvolvimento de brotações de guabijuzeiro <i>in vitro</i> , em meio WPM com 0,4 mg.L ⁻¹ de BAP. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	63
22. (A) Brotação de explante de guabijuzeiro inoculado em meio WPM acrescentado de BAP+ANA (0,4+0,04 mg.L ⁻¹); (B) Brotações de explante inoculado em meio WPM acrescentado de BAP (0,6 mg.L ⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	67
23. Porcentagem de oxidação de segmentos apicais e nodais de guabijuzeiro cultivados em meio de cultura WPM acrescentado de BAP (0,4 mg.L ⁻¹), BAP+ANA (0,4+0,04 mg.L ⁻¹) e Testemunha (sem adição de fitorregulador). (Mesma letra maiúscula para meios de cultura e minúscula para segmentos (apical e nodal) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	68
24. Brotações do 1º subcultivo de guabijuzeiro em meio WPM acrescentado de BAP (0,6 mg.L ⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	71
25. Média do número de brotações de guabijuzeiro no 1º subcultivo, mantendo-se a identificação do tipo de explante utilizado no cultivo inicial (apical e nodal) na fase de multiplicação, após 30 dias em meio de cultura WPM acrescidos de BAP (0,6 mg.L ⁻¹) ou de BAP+ANA (0,4+0,04 mg.L ⁻¹). (Mesma letra maiúscula para explantes e minúscula para meio de cultivo, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	72
26. Altura das brotações de guabijuzeiro no 1º subcultivo, mantendo-se a identificação do tipo de explante utilizado no cultivo inicial (apical e nodal) na fase de multiplicação, após 30 dias em meio de cultura WPM acrescidos de BAP(0,6 mg.L ⁻¹) ou de BAP+ANA (0,4+0,04 mg.L ⁻¹). (Mesma letra maiúscula para explantes e minúscula para meio de cultivo, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	73
27. Porcentagem de sobrevivência e calos de segmentos apicais e nodais do 2º subcultivo de guabijuzeiro cultivados em meio de cultura WPM acrescentado de BAP (0,6 mg.L ⁻¹), 3 FIT (0,03 BAP+ 0,2 ANA + 0,3 GA3 mg.L ⁻¹). Para a % sobrevivência foi utilizado o teste Kruskal-Wallis (fitorregulador P= 0,730, explante p= 0,121).. Para a % calos o teste utilizado foi o Duncan (fitorregulador P= 0,196 e explante p= 0,904). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	75
28. Guabijuzeiro: (A) Brotações com calos na base cultivados em meio com BAP (0,6 mg.L ⁻¹); (B) Detalhe do calo na base das brotações. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	75

	Página
29. Brotações do 2 ^o subcultivo em meio WPM acrescentado de BAP (0,6 mg.L ⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	76
30. Guabijuzeiro: (A) Brotação com raiz cultivada em meio WPM suplementado com ANA (0,6 mg.L ⁻¹); (B) Brotação com raiz e calo cultivada em meio WPM suplementado com ANA (0,6 mg.L ⁻¹); (C) Brotação com calo na base cultivada em meio WPM suplementado com ANA (0,6 mg.L ⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	78
31. Porcentagem de calos em brotações de guabijuzeiro nos meios adicionado de ANA nas concentrações 0,2; 0,4 e 0,6mg.L ⁻¹ . UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.....	79

ABREVIATURAS

AIB - Ácido indolbutírico
ANA - Ácido naftalenoacético
atm – atmosférica
BAP - 6-benzilaminopurina
Brix° Sólidos Solúveis Totais
° C - Graus Celsius
FEPAGRO - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
GA₃ - ácido giberélico
g. L⁻¹ - gramas por litro
µm - micromol
IVGM - Índice de velocidade de germinação modificado
KIN- cinetina
mg.L⁻¹ - Miligrama por litro
mL – Mililitro
mM - milimolar
TMG - Tempo médio de germinação
RS - Rio Grande do Sul
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Vitamina C – ácido ascorbico
v/v - relação volume/ volume
WPM - Woody Plant Medium

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que se destaca por sua riqueza florística, com uma estimativa de cerca de 55 mil espécies vegetais. Deste total, o Rio Grande do Sul, apresenta pelo menos cinco mil espécies de plantas vasculares nativas (Brack *et al.*, 2004).

Espécies nativas pertencentes à família Myrtaceae são abundantes em todo o território brasileiro e em alguns países latino-americanos. Várias espécies dessa família, principalmente as nativas do Brasil, têm frutos comestíveis utilizados há milênios por populações indígenas. Seu uso potencial é enorme, não somente pela possibilidade de consumo do fruto *in natura*, como também para industrialização, como no caso de compostos em bebidas (licores, sucos), geléias, doces, sorvetes, picolés, condimentos, entre outras formas de uso. Além disso, há várias espécies com valor ornamental, quer pela delicadeza das folhagens, quer pela beleza de suas flores e do colorido dos frutos (Lorenzi, 2002; Mattos, 1993).

Muitas espécies da família Myrtaceae apresentam frutos com valores nutracêuticos, sendo excelentes fontes de vitaminas, antioxidante, β -caroteno, flavonóides, etc. Lopes (2009), encontrou 56,59 mg/100g de polpa de vitamina C em frutos de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* D.C.), 54,89 mg/100g de polpa de vitamina C em frutos de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e 94,29

mg/100g de polpa de vitamina C em frutos de grumixameira (*Eugenia brasiliensis* Lam.).

As frutíferas nativas do Sul do Brasil têm um grande potencial para a exploração econômica, principalmente para pequenos produtores, pois conforme Fachinello *et al.* (1995), no Brasil, tem-se despertado para o cultivo de espécies frutíferas nos últimos anos, o que envolve uma grande quantidade de produtores com visão empresarial na condução de seus pomares, devido a fruticultura proporcionar produtos de alto valor agregado, tanto em frutas destinadas ao consumo *in natura* quanto àquelas para industrialização.

Uma característica importante é a qualidade dos frutos que corresponde ao conjunto de atributos ou propriedades que os tornam apreciados como alimentos, dos quais dizem respeito à aparência, rendimento de polpa, número de sementes, sabor, aroma, textura e valor nutritivo. Contudo, tais atributos são fortemente influenciados pela variedade, clima, estágio de maturação, solo, técnicas de cultivo e outros. O conhecimento destes atributos assume uma grande importância, uma vez que podem ser utilizadas técnicas para a sua preservação e seleção de variedades (Fonseca *et al.*, 2006).

Dentre as fruteiras silvestres destaca-se o guabijuzeiro (*Myrcianthes pungens* (Berg) Legr.), que possui várias características que a tornam com potencialidades de utilização comercial, nas quais as mais importantes estão relacionadas com a produção de frutos e à baixa susceptibilidade a doenças. Os frutos podem apresentar boa aceitação para consumo *in natura* ou industrializados, na forma de doces em pastas, cristalizados ou geléias (Mattos, 1994).

Segundo Reitz (1983), o guabijuzeiro tem grandes possibilidades de tornar-se uma árvore frutífera importante no futuro, quando se tiver feito um melhor estudo sobre uma adequada industrialização de frutos de espécies nativas. O mesmo autor relatou que a espécie é indicada para o reflorestamento ao longo das reservas de hidroelétricas, pois além de contribuir para firmar as margens, oferece grandes oportunidades para manutenção da fauna, sobretudo da avifauna de maior porte.

O sistema de propagação do guabijuzeiro é feito basicamente por sementes, porém, este método apresenta como desvantagem a segregação genética, originando plantas com grande variabilidade genética, além de levar um prolongado período juvenil (Pádua, 1983). Donadio *et al.* (2002) ressaltam que o tipo ideal de propagação para a maioria das plantas frutíferas é a propagação vegetativa, na qual, uma parte da planta já em produção, seja uma borbulha, uma estaca ou um ramo (garfo), são usados para originar uma nova planta.

As informações sobre a qualidade dos frutos e a propagação do guabijuzeiro são escassas, sendo necessário ampliar os conhecimentos nesta área, visando maximizar a produção de qualidade. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade dos frutos e estudar a propagação do guabijuzeiro pelos métodos de estaquia, enxertia e micropropagação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição da espécie

O fruto conhecido por guabiju, nome popular de origem indígena “yguabi-iy” (“fruta que se come”) ou ÿgua-pi-iy” (fruta de casca rija), dos guaranis (Pio Correa,1984), *Myrcianthes pungens* (Berg) Legrand pertence à família das Myrtaceae que compreende 102 gêneros e 3.024 espécies conhecidas, distribuídas e cultivadas, principalmente, em países de clima tropical e subtropical. Algumas dessas espécies também ocorrem em regiões de clima temperado (Franzon, 2004).

As mirtáceas têm sido organizadas tradicionalmente em duas subfamílias: Leptospermoideae e Myrtoideae. A primeira ocorre predominantemente na Austrália e Polinésia, e reúne espécies com frutos secos, geralmente cápsulas loculicidas e folhas alternas. A outra, Myrtoideae, predomina na América tropical e subtropical e compreende espécies com frutos carnosos baciformes e folhas opostas (Cronquist 1981; Heywood 1993). Esta subfamília tem uma única tribo, a Myrtae, que é dividida em três subtribos: Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae. Os embriões são importantes para a taxonomia de Myrtaceae (Barroso, 1991), apresentando os tipos mircióide, pimentoide e eugenóide. O guabiju tem o embrião do tipo eugenóide, que

caracteriza-se pelo crescimento dos cotilédones e pela diminuição da radícula, que apresenta-se vestigial ou ausente (Machiori *et al.*, 1997).

O gênero *Myrcianthes*, apresenta cerca de 30 espécies (Grifo, 1992 citado por Apel *et al.*, 2006), a maior parte distribuída na América do Sul, região dos Andes, com ocorrência de quatro delas no Sul do Brasil. Três destas são nativas do Rio Grande do Sul.

O guabijuzeiro tem copa perenifólia e arredondada, podendo atingir de 15 a 25 metros de altura, com tronco normalmente tortuoso e nodoso; as folhas são simples, glabras, de 3-7cm de comprimento, com ápice cuspidado pungente (espinhoso), coloração verde brilhante e com nervura principal impressa na face adaxial; são opacas e têm nervuras salientes na face abaxial. Possui flores tetrâmeras, solitárias ou em grupos de três, de cor branca. Seus frutos são do tipo baga globosa, com polpa carnosa e comestível, coloração roxo-escura e providos de cálice persistente (Lorenzi, 2002; Marchiori *et al.*, 1997). Suas sementes são reniformes, lisas, esverdeadas, de tegumento fino, medindo de 6 a 7 milímetros; cada fruto contém 1 ou 2 sementes (Sanchotene, 1989) (Figura 1). Segundo Longhi (1995), os ramos, quando novos, são pilosos e compridos, depois glabros, fartos, formando copa densa e arredondada, suas raízes são vigorosas e profundas; a madeira é vermelha, muito elástica, densa e durável.

Sua distribuição ocorre naturalmente desde o Estado de São Paulo até o norte do Uruguai, alcançando a Bolívia, Paraguai e Argentina (Legrand, 1968). No Rio Grande do Sul, encontra-se em todas as formações florestais, com exceção da Floresta Atlântica e Restinga Litorânea, sendo particularmente

abundante na região das Missões, na Serra do Sudeste, na Campanha do Sudoeste e na bacia dos rios Íbicui e Quaraí (Marchiori & Sobral, 1997).

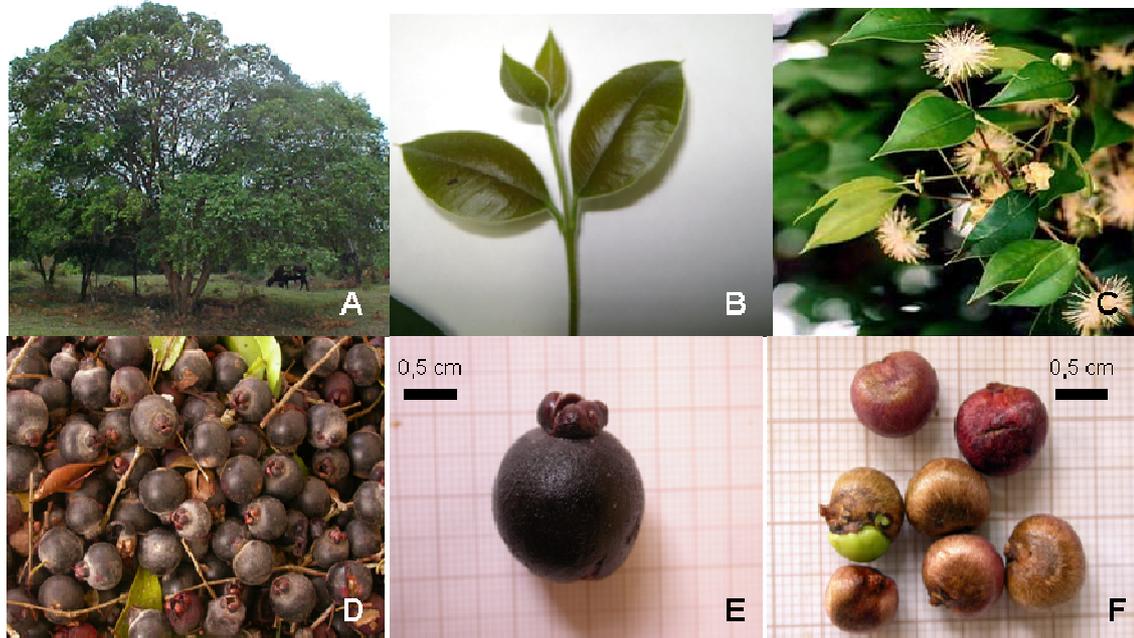


FIGURA 1. *Myrcianthes pungens*, (A) planta adulta (Foto de Claudimar Sidnei Fior); (B) Folhas com ápice cuspidado pungente (espinhoso); (C) Floração (Foto do livro árvores do Sul, Backes & Irgang, 2002); (D e E) Frutos; (F) Sementes. Porto Alegre, RS, 2009.

É uma planta semidecídua, ciófito até mesófito, e seletivo higrófito. Ocorre de forma isolada e descontínua (rara) nas partes úmidas e rochosas das submatas dos pinhais e nas encostas rochosas das formações abertas da bacia do rio Uruguai (Backes & Irgang, 2002).

É uma espécie secundário-tardia e a dispersão de suas sementes é feita por gravidade ou por animais. Ocorre em solos férteis, isoladamente ou em agrupamentos mais ou menos densos, sempre abrigada por outras árvores. Um Kg de frutos tem, aproximadamente, 430g de sementes (frescas) e um Kg de sementes tem cerca de 3.200 unidades (Longhi, 1995). Sua floração ocorre

nos meses de setembro a janeiro e sua frutificação de dezembro a abril (Backes & Irgang, 2002).

A espécie possui diversas utilidades, sua madeira é elástica, densa e resistente, própria para marcenaria de luxo, obras de torno, construção civil, cabos de ferramentas e de instrumentos agrícola. Seus frutos são comestíveis e muito saborosos, com cerca de 25 % de massa comestível; são consumidos *in natura* ou em geléias. São muito apreciados por pássaros. É cultivada em pomares domésticos, principalmente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As flores são melíferas e a árvore é ornamental, podendo ser empregada na arborização urbana, embora ainda pouco cultivada para esta finalidade. É também recomendada para plantios mistos com fins conservacionistas (Lorenzi, 2002, Sanchotene, 1989; Marchiori & Sobral, 1997).

Na medicina popular, esta espécie é utilizada por suas propriedades antidiarréicas (Pio Corrêa, 1984). Apel *et al.* (2006) encontrou no óleo da folha de guabiju 36 compostos onde o β -cariofileno (10,1%), foi o principal deles. Este composto apresenta atividade espasmolítica, anestésica local e antiinflamatória (Limberger *et al.*, 2004).

A propagação da espécie é realizada por sementes. Em nível de viveiro, Sanchotene (1989) observou que em sementes semeadas logo após a coleta a emergência foi de 50% das sementes utilizadas no período de 30 a 40 dias após semeadura. Andrade (2002) obteve 97% de germinação logo após a coleta. Este mesmo autor classificou as sementes de guabijuzeiro como intolerantes à dessecação. Wielewicki *et al.* (2006), classificaram as sementes do guabijuzeiro como recalcitrantes, indicando rolo de papel como substrato

para germinação, e determinaram um padrão para o teor de água de 34,8%, com uma média de 86% de germinação. Santos *et al.* (2004), indicaram uma faixa máxima de germinação nas temperaturas de 20°C a 30°C constantes e 15-30°C alternados, classificando a semente como fo toblástica positiva.

2.2 Frutíferas nativas e a qualidade de seus frutos

Dentre as frutíferas nativas do Brasil, a família Myrtaceae é uma das mais conhecidas, devido ao grande potencial tecnológico de suas espécies nativas. No sul do país são encontradas tanto no estado silvestre quanto cultivadas em pomares domésticos. Dentre elas destaca-se a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), a cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*) a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* B.), a goiabeira serrana (*Acca sellowiana*), o araçazeiro (*Psidium cattleianum* S.) e outras (Lorenzi, 2000). As frutíferas nativas ocupam lugar de destaque nos ecossistemas naturais e seus frutos são comercializados em feiras, com aceitação popular (Simarelli, 2007).

O interesse pelas espécies nativas vem crescendo nos últimos anos, o que incentiva o desenvolvimento de pesquisas sobre as suas características nutricionais e qualidade dos frutos (Tonietto *et al.*, 2008).

A qualidade dos frutos corresponde ao conjunto de atributos ou propriedades que os tornam apreciados como alimentos, dos quais dizem respeito à aparência, rendimento de polpa, número de sementes, sabor, aroma, textura e valor nutritivo. O conhecimento destes atributos assume uma grande importância, uma vez que podem ser utilizadas técnicas para a sua preservação e seleção de variedades (Fonseca *et al.*, 2006).

Algumas análises químicas, como sólidos solúveis totais (SST), pH, acidez total titulável (ATT) e vitamina C, fornecem informações importantes para caracterizar a qualidade dos frutos para consumo.

Segundo Alves (1996), os SST (ou também conhecido como °Brix) pode ser conceituado como sendo todos os constituintes das matérias-primas alimentícias que não a água, e as substâncias mais voláteis que vaporizam a temperatura inferior ou igual a 105 °C. A matéria seca ou sólida total é composta de proteínas, lipídios, glicídios, sais minerais, vitaminas, ácidos orgânicos, pigmentos e outras substâncias fisiológicas ativas ou não, podendo ser divididas em duas classes: água-solúvel (solúvel em água) e água-insolúvel, cujo conhecimento facilita a identificação laboratorial da composição da matéria-prima em estudo. Os SST são usados como índice de maturidade para alguns frutos, e indicam a quantidade de substâncias que se encontram dissolvidas no suco, sendo constituídas na sua maioria por açúcares. É um parâmetro utilizado na agroindústria, para intensificar o controle da qualidade do produto final.

Para Chitarra & Chitarra (1990) a melhor forma de se determinar o sabor de um fruto se dá por meio da relação entre sólidos solúveis totais e acidez total titulável.

Em relação ao pH dos alimentos, vários fatores são importantes, tais como: influência na palatabilidade, desenvolvimento de microrganismos, escolha da temperatura de esterilização, escolha do tipo de material de limpeza e desinfecção, escolha do equipamento com o qual se vai trabalhar na indústria, escolha de aditivos e vários outros (Chaves, 1993).

Segundo Aldrigue *et al.* (2002), a vitamina C tem função muito importante devido a sua ação fortemente redutora. É largamente empregada como agente antioxidante para estabilizar a cor e o aroma do alimento. Além do emprego como conservante, o ácido ascórbico é utilizado para o enriquecimento de alimentos ou restauração, a níveis normais, do valor nutricional perdido durante o processamento.

2.3 Métodos de propagação

A propagação é um conjunto de práticas destinadas a perpetuar as espécies de forma controlada.

Objetiva aumentar o número de plantas, garantindo a manutenção das características agronômicas essenciais das cultivares. Os métodos de propagação podem ser agrupados em dois tipos: sexuada e assexuada (Fachinello *et al.*, 1995).

2.3.1 Propagação sexuada

No processo de propagação sexuada (realizada por sementes) as plantas formadas, apesar de serem semelhantes à planta de origem, são geneticamente diferentes, sendo, portanto, muito importantes do ponto de vista da evolução das espécies e também para trabalhos de melhoramento genético. Mas, segundo Donadio *et al.* (2002), a propagação sexuada apresenta algumas desvantagens: não assegura a manutenção das características da planta que forneceu as sementes, devido, principalmente, à possibilidade de cruzamento natural com outras variedades da mesma espécie, o que pode originar plantas híbridas ou segregantes; além disso, o período de juvenilidade é muito longo. A

fase juvenil é o período em que a planta tem pouca resposta aos estímulos indutores do florescimento (fotoperíodo, frio, hormônios e outros). É um período geralmente de longa duração (de 3 a 10 anos, no caso do guabijuzeiro), que é marcado pela ausência de produção e pela presença de algumas características, tais como espinhos, elevado vigor e morfologia diferenciada das folhas, dependendo da espécie (Fachinello *et al.*, 1995).

Nas espécies silvestres, não domesticadas, ou com pouca seleção dirigida, a variabilidade genética é expressa em intensa heterogeneidade (fenotípica) das populações, o que em cultivos comerciais causam muitos entraves no manejo, como diferenças na altura das plantas, na formação das copas, épocas de florescimento, na classificação de produção dos frutos como diferenças no tamanho, formato e coloração.

2.3.2 Propagação vegetativa

A propagação assexuada, vegetativa ou agâmica é o processo de multiplicação que ocorre, através de mecanismos de divisão e diferenciação celular, por meio da regeneração de partes da planta-mãe (Fachinello *et al.*, 1995). Geralmente este método é utilizado quando a propagação sexuada não é satisfatória, quando o número de plantas exigido pelo mercado não é suficiente ou ainda, quando é de interesse a propagação de plantas com características selecionadas. Neste tipo de propagação está incluída a macropropagação, a qual pode ser obtida por meio das técnicas de estaquia, enxertia e mergulhia, e a micropropagação, que é obtida por meio das técnicas de embriogênese somática, proliferação de gemas adventícias e axilares (Hartmann *et al.*, 2002).

O método de propagação vegetativa possibilita a manutenção das características da planta matriz, tais como: produção, qualidade do fruto, precocidade e sanidade (Hartmann & Kester, 1983).

Os relatos na literatura sobre a propagação vegetativa de guabijuzeiro são poucos (Coutinho, 1991; Santarosa, 2008), tornando-se indispensável a investigação científica.

2.3.2.1 Estaquia

A propagação vegetativa feita por meio de estacas é um dos métodos mais importantes da macropropagação de espécies frutíferas, florestais e arbustivas ornamentais. Para espécies que podem ser facilmente propagadas por estacas, esse método apresenta numerosas vantagens, dentre as quais a de ser econômico, rápido, simples e não exigir técnicas especiais (Hoppe *et al.*, 1999).

A capacidade natural de enraizamento de estacas de plantas frutíferas lenhosas é variada, assim como a resposta às concentrações de reguladores vegetais. Coutinho *et al.* (1991), estudando o enraizamento de estacas semilenhosas de frutíferas nativas da família Myrtaceae onde usou ácido indolbutírico (AIB) (0, 1, 2, 3, 4 e 5 g.L⁻¹) em pó, observaram que estacas de guabijuzeiro, pitangueira e cerejeira-do-mato não enraizaram, mesmo tratadas com AIB. É importante ressaltar, que além dos fatores genéticos o baixo enraizamento dos propágulos vegetativos pode estar relacionado a fatores intrínsecos ao material vegetal como a idade do tecido, o tipo e época de coleta das estacas, a concentração de fitohormônios ou a fatores exógenos como as condições de cultivo das plantas matrizes.

Segundo Fachinello *et al.* (1995), em algumas espécies, como as pertencentes à família das Mirtáceas, ocorre oxidação de compostos fenólicos no local onde é feito o corte nas estacas. Essa oxidação que dificulta a formação de raízes e é observada pelo escurecimento dos tecidos.

Scarpore *et al.* (2002), em experimento realizado com jabuticabeira (*Myrciaria jaboticaba* Berg.), obtiveram 20 %, 33 %, 35 %, 11 % e 23 % de enraizamento em estacas herbáceas tratadas com AIB, nas concentrações de 0, 3, 6, 9 e 12 g L⁻¹, respectivamente.

Duarte *et al.* (1997) verificaram até 60% de enraizamento quando as estacas de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg.) tratadas com diferentes concentrações de AIB (0, 1, 3 e 8 g.L⁻¹) foram submetidas à nebulização intermitente.

Nachtigal *et al.* (1994), trabalhando com araçazeiro (*Psidium catleyanum*), observaram que o aumento de concentrações de AIB aplicado na forma de pó proporcionou aumento no percentual de enraizamento, até a concentração de 4 g. L⁻¹ (59%), diminuindo o percentual de enraizamento a partir de 6 g L⁻¹.

Lima *et al.* (1992) estudando aceroleira (*Malpighia glabra*) não verificaram efeito positivo do AIB na formação das raízes, mas a interação de estacas com maior tamanho e com consistência semilenhosa apresentaram maior porcentagem de enraizamento.

2.3.2.2 Enxertia

A enxertia é outro método de propagação vegetativa na qual se colocam em contato duas porções de tecido vegetal, de tal maneira que se unam e

posteriormente se desenvolvam, originando uma nova planta. Segundo Simão (1998), este método de propagação apresenta basicamente três processos: a borbulhia, a encostia e a garfagem, existindo ainda variações destes três tipos. Na borbulhia ocorre a justaposição de uma pequena porção da casca de uma planta (enxerto) contendo apenas uma gema, com ou sem lenho, em outra planta (porta-enxerto), conforme o modo de incidência da gema, existem várias formas de se realizar a enxertia de borbulhia. A encostia consiste na união de duas plantas, que continuam sobre seus respectivos sistemas radiculares, até que ocorra a soldadura (união) entre as partes vegetativas, que irá possibilitar a separação do enxerto de seu sistema radicular. O processo de garfagem é definido como sendo aquele que se realiza a soldadura de um segmento de ramo (denominado de garfo) sobre uma planta enraizada, conhecida como porta-enxerto, e que permitirá o desenvolvimento do conjunto.

A enxertia de garfagem é citada na literatura para uma série de espécies frutíferas nativas, como camu-camu (*Myrciaria dúbia*) (Suguino *et al.*, 2003), pitangueira (*Eugenia uniflora*) (Bezerra *et al.*, 1999, 2002), entre outras.

A enxertia pode ser utilizada para propagar plantas que não podem ser multiplicadas por outros métodos (Fachinello *et al.*, 1995).

Algumas espécies nativas têm dificuldade de se propagar através de estacas. Um exemplo é a goiabeira serrana (*Acca sellowiana*), na qual Mielke (1992) estudando sua propagação observou que os melhores resultados foram obtidos com enxertos feitos no início de agosto, sendo que a borbulhia de gema com lenho proporcionou 58% de pagamento, ao passo que a enxertia de garfagem por fenda cheia proporcionou 45% e a por fenda dupla, 35% em porta-enxertos embalados e mantidos em telados.

Lattuada *et al.* (2008), estudaram a viabilidade da técnica de enxertia por garfagem herbácea entre duas espécies da família Myrtaceae, *Eugenia uniflora* (pitangueira) e *Eugenia involucrata* (cerejeira-do-mato), testaram combinações entre porta-enxerto e enxerto das duas espécies, obtendo 60% de pagamento entre enxerto e porta-enxerto de pitangueira.

2.3.2.3 Micropropagação

A técnica de micropropagação é uma alternativa na propagação vegetativa de plantas nativas. Segundo Cid *et al.* (1997), a micropropagação tem sido utilizada para propagação de algumas espécies florestais nativas e para o estabelecimento de matrizes para produção de sementes. Entretanto, são necessários estudos básicos de micropropagação para a maioria das espécies lenhosas. Uma das vantagens desta técnica é que se pode obter grande número de propágulos a partir de pequeno número de plantas elite, devido ao pequeno tamanho dos explantes (célula, tecido ou um órgão), enquanto na macropropagação o número de explantes retirados da planta matriz pode ser limitado (Liew & Teo, 1998). A cultura *in vitro* requer pequeno espaço para manter ou para aumentar o número de plantas e pode produzir plantas livres de patógenos como vírus. Além disso, as taxas de propagação são maiores e, em pouco tempo, pode-se produzir clones de plantas que apresentam dificuldades de propagação via macropropagação. Outra vantagem desta técnica é a produção das mudas independente da época do ano (George, 1993).

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas que tem como princípio o isolamento de um explante e seu cultivo sob condições de

plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (Costa, 2006). Esta técnica baseia-se na teoria da totipotência celular, a qual se caracteriza como a capacidade que a célula vegetal viva, como sistema laminar intacto, nucleada e já diferenciada, possui de ser induzida a voltar a seu estado meristemático, podendo redefinir seu estado de diferenciação celular, desenvolvendo novos tecidos, órgãos e, até mesmo, organismos inteiros (Termingnoni, 2005).

Meios de cultivo são combinações de sais minerais (macro e micro nutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Podem ser gelificados (adicionando-se ágar ou outro agente para geleificação) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo (Guerra & Nodari, 2006). Os meios nutritivos fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos cultivados e também participam do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998). A constituição de cada meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais para atender necessidades específicas (Guerra & Nodari, 2006). Existem diversas formulações de meios de cultivo onde, uma delas é o meio básico WPM (*Wood Plant Medium* (Lloyd & McCown, 1980) que foi desenvolvido para cultura de brotações de plantas lenhosas (Brum, 2001).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o método de micropropagação é dividido em diferentes estágios, sendo eles: estágio I: seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento em meio nutritivo *in vitro*; II: multiplicação dos propágulos mediante sucessivos subcultivos em meio próprio para a multiplicação; estágio III: transferências das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato (aclimatização) em condições *ex-vitro*. Este esquema não precisa

necessariamente ser seguido, permitindo alterações conforme as peculiaridades de cada espécie.

Um ponto crucial da cultura de tecidos é a instalação da planta na condição *in vitro* livre de microrganismos. Para tanto, é necessário determinar condições de desinfestação adequadas para garantir um ambiente mais asséptico possível sem danificar os explantes (Torres *et al.*, 1998). Espécies lenhosas apresentam problemas de contaminação por permanecerem por longos períodos expostas às intempéries (Bonga, 1982). Uma maneira de facilitar a obtenção de material vegetal sem contaminação é a germinação de sementes *in vitro*, para isso é necessário realizar uma desinfestação eficiente das sementes.

No protocolo descrito por Yassen *et al.* (1995), para propagação *in vitro* da goiabeira (*Psidium guajava*), o fungicida benomyl (50% por 10 minutos) seguido de hipoclorito de sódio (0,79% por 20 minutos) foram utilizados com sucesso na desinfestação de sementes.

Em explantes coletados de plantas adultas o índice de contaminação é, normalmente, muito alto. Esses índices de contaminação podem ser reduzidos através de pulverizações com inseticidas e fungicidas; envolvimento dos brotos das plantas em sacos plásticos ou mantendo-as em casa-de-vegetação (Hartmann *et al.*, 2002). Brotos de plântulas de goiabeira (*Psidium guajava*) foram desinfestados em etanol 70% por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos. O resultado foi 70% de explantes desinfestados e baixa necrose (Rocha, 2005 apud Khattak *et al.*, 1990).

Além da vantagem da obtenção de tecidos menos contaminados, de acordo com Grattapaglia & Machado (1998), o material juvenil apresenta

algumas vantagens do ponto de vista experimental, pois pode ser obtido um grande número de explantes com elevada capacidade de crescimento e também rápida resposta à aplicação de fitorreguladores. Logo, esse tipo de explante pode orientar e auxiliar a elaboração de protocolos para posterior aplicação em tecidos de plantas adultas.

A multiplicação é a fase mais longa da micropropagação e visa produzir o maior número possível de plantas uniformes e de alta qualidade (Grattapaglia & Machado, 1998.). O meio nutritivo deve estar de acordo com a exigência da planta, porém, o fator chave da multiplicação é a presença dos reguladores de crescimento vegetal, particularmente citocininas e auxinas (Cordeiro *et al*, 2004). As citocininas são reguladores de crescimento que desempenham um papel fundamental no crescimento e cultivo de tecidos, estimulando a divisão celular, bem como, a indução e a proliferação de gemas axilares, além de quebrarem a dominância apical (Hu & Wang, 1983). Segundo Torres *et al.* (1998), das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP), é a que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, sendo utilizada em aproximadamente 60% dos meios de cultivo. As concentrações de citocinina podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante. Meios com 0,05 a 1,0 mg.L⁻¹ de BAP tem sido utilizados com bons resultados para o cultivo de ápices caulinares de várias espécies lenhosas (Torres *et al.*, 1998).

A etapa de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo o posterior transplântio para condições *ex vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para promover o enraizamento as auxinas mais utilizadas são o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA) (Assis & Teixeira, 1998). O enraizamento de espécies herbáceas é geralmente fácil, mas no caso das espécies lenhosas, que inclui a maioria das frutíferas, é a etapa mais difícil (Schuch & Erig, 2005). O enraizamento de lenhosas é dependente da relação entre os níveis de auxina e citocinina, participação de outras substâncias reguladoras de crescimento (por exemplo: as giberelinas e o ácido abscísico), influência de co-fatores e fatores fisiológicos e externos (Assis; Teixeira, 1998). A melhor substância promotora do enraizamento, bem como as concentrações e métodos de utilização mais adequados para uma determinada situação, variam com a espécie (Fachinello *et al.*, 1994).

O conhecimento de todos os processos (desinfestação, multiplicação, enraizamento e aclimatização do material vegetal) é fundamental para controlar a organogênese *in vitro* e possibilitar a micropropagação de plantas selecionadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises físico-química de frutos de guabijuzeiro

Foram analisados frutos de guabijuzeiros (*Myrcianthes pungens* (Berg) Legr.) procedentes de três localidades. A primeira coleta foi realizada na unidade da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) localizada no município de Maquiné, RS, (GPS: 29°39'46,2" S; 50°13'20,5" O) a colheita foi realizada no dia 09/02/2009, no período da tarde. Foram colhidos 450 frutos de uma planta (exsicata registrada no herbário da UFRGS, ICN:163362). Na segunda, a colheita foi realizada dia 18/02/2009, à tarde, de uma planta (exsicata registrada no herbário da UFRGS, ICN:163360) localizada em Porto Alegre (GPS: 30°12'08,4" S; 51°03'24,33" O), no bairro Lami (PoA 1), onde foram colhidos 350 frutos. A última procedência foi de frutos comprados na Feira Ecológica do Bom Fim (dia 24/02/09), no Parque da Redenção em Porto Alegre, sendo os frutos provenientes de uma planta localizada no bairro Lami em Porto Alegre (PoA 2) (GPS: 30°12'03,12" S; 51°03'02,82" O), coletados pela manhã (400 frutos).

Para a colheita os ramos de cada árvore foram agitados manualmente de forma a forçar a queda dos frutos sob uma rede previamente disposta sob a copa. Foram selecionados todos os frutos que apresentavam características de maturação, com coloração roxa escura do epicarpo. Após a colheita os frutos

foram armazenados em sacos plásticos e transportados para o Laboratório de Fisiologia de Pós-colheita do Departamento de Horticultura e Silvicultura, da Faculdade de Agronomia UFRGS, e conservados em geladeira ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) até o dia seguinte. Os frutos com procedência de Maquiné e PoA 1 foram separados em quatro repetições de 30 e 25 frutos, respectivamente. Com auxílio de um paquímetro digital, os frutos tiveram seu diâmetro medido na parte intermediária com o cálice voltado para cima (Figura 2).



FIGURA 2. Diâmetro de fruto de guabijuzeiro medido com auxílio de um paquímetro digital, os frutos maduros tiveram seu diâmetro medido na parte intermediária com o cálice voltado para cima. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

As características químicas analisadas foram: sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT), SST/ATT (relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável), da polpa e casca dos frutos, o pH da casca e da polpa e a vitamina C da polpa (mg de ácido ascórbico por 100 g) dos frutos de guabijuzeiro.

O procedimento de mensuração das análises de SST, ATT, SST/ATT e pH (AOAC, 1990) foram efetuados conforme as seguintes etapas:

Preparação das Amostras:

Para fins de análise foram separadas a casca (epicarpo) e a polpa (endocarpo) dos frutos. As amostras de polpa, de no mínimo 60 frutos foram obtidas com a homogeneização em um processador mix marca Wallita. As amostras de casca primeiramente foram trituradas com o auxílio de um liquidificador e em seguida homogeneizados em processador mix por tempo suficiente para obter uma pasta homogênea.

As amostras foram dispostas em frascos com tampa, identificadas e armazenadas em freezer ($-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$) até a análise de sua composição.

Para dar início às análises químicas as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente.

- Determinação de SST: foi realizado através de leitura em refratômetro digital marca Atago (0-53% Brix). Para a determinação foi depositada uma pequena amostra homogênea (duas a três gotas) sobre o prisma do refratômetro e em seguida, efetuou-se a leitura da porcentagem de SST da amostra, já corrigida para a temperatura de 20°C . Limpou-se o prisma entre as leituras das amostras com água destilada, secando completamente a superfície do mesmo com papel absorvente. Para cada amostra confirmou-se o valor após três leituras.

- Determinação do pH: Foi utilizado um potenciômetro marca Digimed/modelo DM20, o qual foi calibrado previamente ao uso com as soluções padrão de pH 7,00 e 4,00. Aproximadamente 6g de amostra (polpa e da casca) homogeneizada foi medida em copo de Becker de 250 mL, em balança eletrônica analítica marca OHAUS/modelo AS200, em seguida, foram adicionados 50 mL de água destilada.

- Determinação de acidez total titulavel (ATT): Foi realizada por titulometria de neutralização, com a diluição de 6g da amostra em 50mL de água destilada. Cada amostra foi titulada, com o auxílio de uma bureta de 'zero' automático, vertendo-se uma solução de NaOH padronizada em 0,1 N até atingir o ponto final (pH 8,1) e anotou-se o volume de soda gasto em cada titulação. O cálculo da ATT foi realizado com a seguinte fórmula: $ATT (\% \text{ ácido cítrico}) = \frac{\text{volume gasto de NaOH (mL)} \times \text{concentração do NaOH} \times 0,06404 \times 100}{\text{massa da amostra (g)}}$. O valor 0,06404 é o miliequivalente-ácido do ácido cítrico.

- Determinação da relação SST/ATT: Foi determinada pelo quociente entre SST e ATT.

- Determinação da Vitamina C: Os teores de vitamina C foram determinados em relação ao ácido L-ascórbico pelo método fotolorimétrico da reação com o corante 2,6-diclorofenol indofenol (AOAC nº 43.056, 2000). Para tanto uma amostra de 30g de polpa foram diluídos em 100 mL de ácido oxálico (4:1000) e filtrados, adicionados de 1,1 mL de EDTA (0,1M) para estabilizar a vitamina

(Hernandez, *et al.*, 2006 e Kechinski, 2007), e a uma alíquota de 10 mL desse extrato adicionado de 3 mL da solução de tampão citrato de sódio (pH 4,5) (Fernandez *et al.*, 2007, Kechinski, 2007). Por fim, realizou-se a adição de 1,5 mL do corante e 1,5 mL do extrato em cubetas de poliestireno descartáveis e as leituras foram realizadas a 530nm em um espectrofotômetro UV-VIS modelo T6 (PG Instruments) e posteriormente comparadas com as leituras obtidas na curva padrão.

3.2 Propagação vegetativa

3.2.1 Propagação de guabijuzeiro por estaquia

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia em Horticultura do Departamento de Horticultura e Silvicultura da UFRGS, localizada em Porto Alegre.

As coletas das estacas foram realizadas em duas épocas do ano, ambas pela manhã, a primeira foi realizada dia 04 de fevereiro de 2009 e a segunda no dia 27 de outubro de 2009, de um guabijuzeiro (exsicata registrada no herbário da UFRGS, ICN:163359) da coleção de frutíferas da Estação Experimental da FEPAGRO, localizada no município de Viamão, RS, (30°02'16.42"S; 51°01'32.18"O) (Figura 3 A). Os ramos foram cortados com tesoura de poda e acondicionados em sacos plásticos, sendo transportados para o Laboratório de Biotecnologia em Horticultura.

No Laboratório os ramos foram seccionados, produzindo estacas apicais de aproximadamente 6 cm de comprimento, contendo quatro folhas (Figura 3

B). Após as estacas foram colocadas em água destilada onde permaneceram por aproximadamente três horas.

Como recipientes, foram utilizadas bandejas multicelulares de poliestireno expandido contendo 72 células, preenchidas com uma mistura de casca de arroz carbonizada e vermiculita (1:1 v/v). Momentos antes do estabelecimento no substrato, as bases das estacas foram cortadas com auxílio de uma lâmina bisturi em ambos os lados expondo maior superfície do câmbio (Figura 4), onde foram aplicados os tratamentos, através da imersão das bases das estacas.



FIGURA 3. (A) Árvore adulta de guabijuzeiro – FEPAGRO, Viamão; (B) estaca apical com aproximadamente 6 cm de comprimento com quatro folhas - UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.



FIGURA 4. Detalhe do corte realizado em ambos os lados na base da estaca de guabijuzeiro com aproximadamente 1,5cm, expondo o câmbio vascular. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Os tratamentos compreenderam:

- 1- Estacas apicais sem tratamento com fitorreguladores;
- 2- Estacas apicais com prévia imersão da base, durante 10 segundos, em solução com AIB, na dose de 2 g L^{-1} ;
- 3- Estacas apicais com prévia imersão da base, durante 10 segundos, em solução com AIB, na dose de 4 g L^{-1} ;
- 4- Estacas apicais com prévia imersão da base, durante 10 segundos, em solução com AIB, na dose de 6 g L^{-1} ;
- 5- Estacas apicais com prévia imersão da base, durante 10 segundos, em solução com vitamina C, na dose de 3 g L^{-1} .

Após a aplicação dos tratamentos foi inserida uma estaca por célula. A parte basal da estaca (cerca de 2 cm) foi introduzida no substrato, sobre um orifício previamente preparado. Em seguida o substrato foi levemente

comprimido ao redor da mesma para melhorar o contato do substrato com a base da mesma (Figura 5).

Após o estabelecimento das estacas, as bandejas foram levadas para a casa de vegetação (70% de sombreamento) com sistema de irrigação por nebulização intermitente programado para irrigar durante um minuto a cada 20 minutos. A temperatura e umidade foram monitoradas durante todo o experimento.



FIGURA 5. Estacas apicais de guabijuzeiro estabelecidas em bandejas multicelulares para enraizamento em substrato contendo casca de arroz carbonizada e vermiculita (1:1 v/v), em casa de vegetação com nebulização intermitente. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

O delineamento experimental foi completamente casualizado com quatro repetições de dez estacas por tratamento e repetição, totalizando 400 estacas. As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90 e 120 dias, sendo aos 30, 60 e 90 dias avaliada a retenção foliar e aos 120 dias a porcentagem de calos, raízes e número de raízes por estaca.

3.2.2 Propagação de guabijuzeiro por enxertia de garfagem

O estudo foi conduzido em outubro de 2009, em ambiente de telado (tela de cor preta com 60% interceptação de luz, sem sistema de irrigação controlado) do Laboratório de Biotecnologia em Horticultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Os porta-enxertos de *Myrcianthes pungens* foram obtidos a partir de sementes, e os enxertos (garfos) foram coletados de uma árvore adulta, localizada na Estação da FEPAGRO, em Viamão, RS (GPS: 30°02'16.42"S; 51°01'32.18"O). Os enxertos foram realizados por um profissional especializado.

Os tratamentos avaliados foram:

Experimento 1: Realizou-se enxertia com porta-enxertos de idades diferentes. Foram enxertados garfos com aproximadamente 8 cm de comprimento em trinta porta-enxertos com 7 meses de idade e textura do caule semilenhoso com diâmetro entre 2,68 e 7,54mm, e enxertados garfos em trinta porta-enxertos com 1 ano e 2 meses de idade e textura do caule lenhoso com diâmetro entre 4,32 e 8,27mm.

Experimento 2: Enxertados garfos com aproximadamente 8 cm de comprimento em sessenta porta-enxertos com 10 meses de idade, os porta-enxertos foram agrupados em três grupos, conforme o diâmetro do caule sendo: vinte plantas com diâmetro pequeno (2,14 a 3,18mm) e caule semilenhoso; 20 plantas com diâmetro médio (3,19 a 4,23mm) e caule lenhoso; 20 plantas com diâmetro grande (4,38 a 6,90cm) e caule lenhoso.

Para todos os experimentos foi utilizado o método de enxertia de garfagem do tipo fenda cheia, sendo seccionada a parte apical do porta-enxerto a uma altura entre 10 e 15cm do solo. Neste ponto, procedeu-se um corte longitudinal no centro do caule de modo a formar a fenda, para posterior inserção do garfo. A preparação deste foi feita com auxílio de um canivete de enxertia, com o qual se fez uma cunha na parte inferior do enxerto (garfo), de maneira que ao introduzi-lo na fenda formada no porta-enxerto as duas partes ficaram unidas, mantendo o cambio vascular de ambos em contato.

Após, no local de união entre enxerto e porta-enxerto, foram fixadas ambas as partes com fita plástica. Para finalizar o processo, nos porta-enxertos com caule semilenhoso, os garfos foram cobertos com parafilme (Figura 6A) para diminuir a perda de umidade, e nos porta-enxertos com caule lenhoso os garfos foram cobertos com um saco plástico transparente amarrado levemente com um arame, formando uma câmara úmida (Figura 6B).

O delineamento foi completamente casualizado para os dois experimentos. Para o experimento 1 foram utilizadas três repetições de dez porta-enxertos para cada tratamento. No experimento 2 foram utilizadas quatro repetições de cinco porta-enxertos para cada tratamento.



FIGURA 6. (A) Garfos de guabijuzeiro com caule semilenhoso enxertados em porta-enxertos de guabijuzeiro cobertos com parafilme; (B) Garfos de guabijuzeiro com caule lenhoso enxertados em porta-enxertos de guabijuzeiro cobertos com um saco plástico transparente. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

3.2.3 Micropropagação

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia em Horticultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

O meio de cultura utilizado nos experimentos foi o WPM (Apêndice 1), adicionados de 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 (experimentos 1, 2, e 3) ou 6 (experimentos 4, 5 e 6) antes da esterilização, a qual foi realizada por autoclavagem por 15 minutos sob temperatura de 120°C e pressão de 1,2 atm. Nos experimentos com fitorreguladores estes foram adicionados aos meios de cultura antes da autoclavagem.

Após a inoculação as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo de 16 horas de luz (lâmpadas fluorescentes). Foram realizados seis experimentos, conforme descrição abaixo.

3.2.3.1 Experimento 1: Efeito do hipoclorito de sódio na desinfestação das sementes *in vitro* de guabijuzeiro

Frutos foram coletados dia 09/02/2009 de duas plantas situadas lado a lado, na Estação Experimental da FEPAGRO, em Maquiné, RS. As plantas eram bastante semelhantes, tanto em dimensões das copas como diâmetro do tronco. Os frutos de cada planta apresentavam aspecto típico da fase de maturação (coloração roxo escura do epicarpo). Logo após a coleta, os frutos foram levados para o laboratório e selecionados constituindo um lote. As sementes foram extraídas manualmente em água corrente, separando as sementes da polpa, onde iniciaram os testes de teor de água e desinfestação das sementes.

Foi separada uma amostra aleatória de 560 sementes para a realização dos testes. Uma parte da amostra (3 repetições de 10 sementes) foi para a avaliação do teor de água das sementes (TA), determinada pelo método de estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 24 h,

O restante da amostra foi separada em cinco subamostras de 100 sementes, para a realização do teste de desinfestação, que iniciou com a imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio nas concentrações 0, 2, 4, 6 e 8% (v/v), acrescido de 5 gotas L^{-1} de

Tween®20, por 20 minutos. Posteriormente as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar e lavadas em água destilada estéril (três enxágües) e estabelecidas em tubos de ensaio 25 x 150 mm , com 40 mL de meio de cultivo cada, uma semente por tubo. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Foram avaliadas, a porcentagem de contaminação e germinação aos 30 dias, e calculados o vigor das sementes pelos testes de tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVGM), calculados pelas fórmulas:

- Tempo médio de germinação (TMG): Seguiu-se a fórmula citada por Silva & Nakagawa (1995), com base na soma do número de sementes germinadas em cada avaliação, dividido pelo respectivo tempo com o resultado expresso em dias após a semeadura.
- Índice de velocidade de germinação (IVGM): utilizou-se a fórmula proposta por Silva & Nakagawa (1995) modificada por Santana & Ranal (2004), com base na soma do número de sementes germinadas em cada avaliação, dividido pelo respectivo tempo, dividindo-se o resultado final pelo número total de sementes germinadas em cada repetição.

3.2.3.2 Experimento 2: Efeito do BAP na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais de plântulas de guabijuzeiro

Para a preparação do material vegetal foram utilizados segmentos apicais retirados de plântulas provenientes de sementes germinadas e crescidas *in vitro* com 90 dias de idade (Figura 7 A e B).

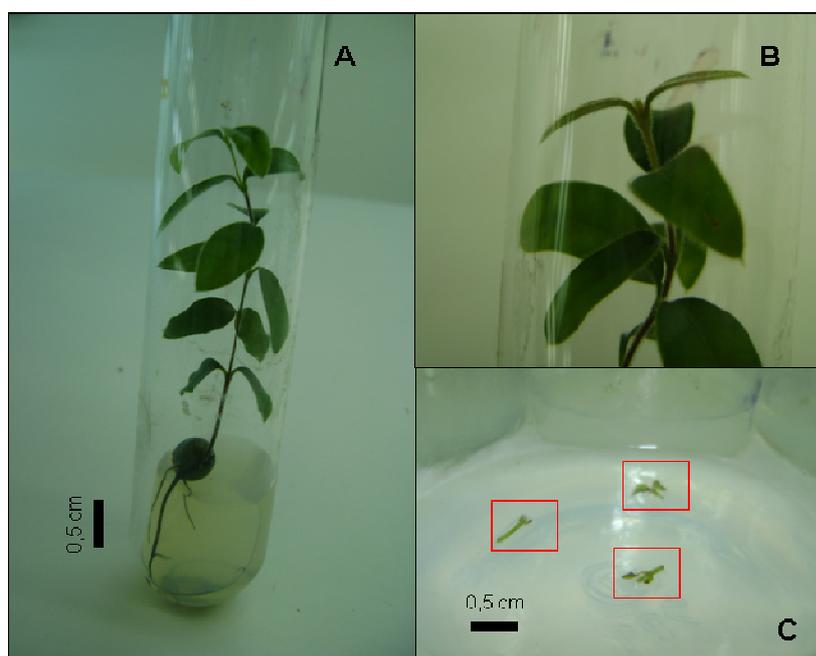


FIGURA 7. (A) Plântula de guabijuzeiro obtida *in vitro* em meio WPM com 90 dias de idade após a inoculação da semente; (B) Detalhe do segmento apical de plântula de guabijuzeiro; (C) Segmentos apicais de plântulas de guabijuzeiro inoculados em meio WPM. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Os segmentos apicais foram cortados com uma lâmina de bisturi, sendo cada segmento seccionado com aproximadamente 0,4cm de comprimento (Figura 7C). Os explantes foram inoculados em frascos de vidro (6x8cm) contendo aproximadamente 30 ml de meio de cultura, tampados com tampas de plástico (polietileno).

Os tratamentos foram constituídos por diferentes concentrações de BAP (0, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg.L⁻¹).

O delineamento foi completamente casualizado com quatro repetições, contendo três frascos com três segmentos apicais em cada frasco.

Após trinta dias da inoculação, foram avaliadas a porcentagem de brotação e oxidação, e as médias do número de folhas, número e altura de brotações por explante.

3.2.3.3 Multiplicação de segmentos nodais e apicais de plântulas de guabijuzeiro

a) Experimento 3:

Foram utilizados segmentos apicais e nodais retirados de plântulas cultivadas *in vitro* com 120 dias de idade.

Com o auxílio de um bisturi, os segmentos apicais foram seccionados com aproximadamente 0,4 cm, e os nodais com aproximadamente 0,6 cm de comprimento, sendo que cada segmento nodal continha duas gemas axilares opostas.

Os explantes foram inoculados em frascos de vidro (6x8cm) contendo aproximadamente 30 ml de meio de cultura, fechados com tampas de plástico (polietileno). Além dos tipos de explantes, foram testados meios sem fitorreguladores, com BAP (0,4 mg.L⁻¹), e com ANA+BAP (0,04 + 0,4 mg.L⁻¹).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x2 (três meios de cultivo x dois tipos de explantes). Foram utilizadas

quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por cinco frascos com três segmentos cada.

A avaliação foi realizada trinta dias após a inoculação, sendo considerados: a porcentagem de brotação e oxidação, e as médias do número de folhas, número e altura de brotações por explante.

b) Experimento 4: 1° subcultivo

Neste experimento foram utilizadas brotações proveniente de segmentos apicais e nodais do experimento anterior (Experimento 3). Estas plântulas brotações foram inoculadas em frascos de vidro (6x8cm) contendo aproximadamente 30 ml de meio de cultura por frasco, fechados com tampas de plástico (polietileno).

Testou-se brotações provenientes de segmentos apicais e nodais inoculados em meios com BAP+ANA (0,04 + 0,4 mg.L⁻¹) e BAP (0,6 mg.L⁻¹).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2 (dois meios de cultivo x dois tipos de segmentos). Foram utilizadas sete repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um frasco com cinco explantes.

Trinta dias após a inoculação foram avaliadas a porcentagem de brotação e oxidação, e as médias do número de folhas, número e altura de brotações por explante.

c) Experimento 5: 2° subcultivo

Para este experimento foram utilizadas brotações obtidas no experimento anterior (Experimento 4), as brotações dos segmentos apicais e

nodais foram inoculadas em frascos de vidro (6x8cm) contendo aproximadamente 30 ml de meio de cultura por frasco, tampados com tampas de plástico (polietileno).

Foram testados segmentos apicais e nodais inoculados em meios com BAP ($0,6\text{mg.L}^{-1}$) e BAP $0,03\text{ mg.L}^{-1}$ + ANA $0,2$ + GA₃ $0,3\text{ mg.L}^{-1}$ mg.L^{-1} (3FIT).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x2 (dois meios de cultivo x dois tipos de segmentos). Foram utilizadas sete repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um frasco contendo cinco explantes.

Foram avaliados trinta dias após a inoculação: a porcentagem de brotação e oxidação, as médias do número de brotações e folhas por explante, e altura das brotações.

3.2.3.4 Experimento 6: Efeito do ANA e do AIB no enraizamento *in vitro* de guabijuzeiro

Neste experimento foram utilizadas brotações produzidas no experimento cinco. Foram selecionadas brotações com altura entre 0,6 até 2,5cm (Figura 8).

Os tratamentos consistiram em três doses de ANA (0,2; 0,4; 0,6 mg.L^{-1}) e AIB (0,2; 0,4; 0,6 mg.L^{-1}). Os materiais foram inoculados em frascos de vidro (6x8cm) contendo aproximadamente 30 ml de meio de cultura por frasco, fechados com tampas de plástico (polietileno).

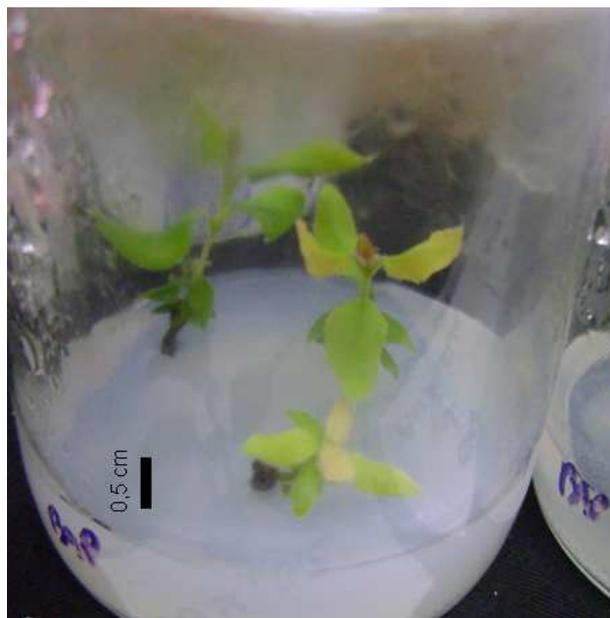


FIGURA 8. Propagação *in vitro* de guabijuzeiro: Brotações com diferentes alturas (entre 0,6 e 2,5cm) obtidas em meio WPM acrescentado de BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com doze repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um vidro com três explantes.

Foram avaliados, quarenta e cinco dias após a inoculação, a porcentagem de brotações vivas, com calo e de brotações enraizadas.

3.3 Análise estatística

Os dados obtidos que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade foram submetidos à análise de variância paramétrica. Quando não houve distribuição normal ou homocedasticidade, mesmo através de transformações de dados, procedeu-se a análise não paramétrica através do teste de Kruskal-Wallis. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro, exceto nos experimentos 1 (Efeito do hipoclorito de sódio no estabelecimento *in vitro* de guabijuzeiro) e 6 (Efeito do ANA e AIB

no enraizamento *in vitro* de guabijuzeiro) de micropropagação, onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e Dunn's respectivamente a 5% de probabilidade de erro. Estas análises foram realizadas pelo programa computacional SigmaStat.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises físico-química de frutos de guabijuzeiro

Os frutos das diferentes matrizes de guabijuzeiro apresentavam coloração roxa escura do epicarpo, caracterizando frutos no estágio maduro. Apesar dos frutos estarem visualmente no mesmo estágio de maturação algumas características físico-químicas analisadas foram diferentes entre as procedências (Tabela 1).

A porcentagem de sólidos solúveis totais (SST) variou entre as amostras das três procedências estudadas, principalmente a polpa (Tabela 1), que variou de 8,9% a 23,6%, a casca ficou entre 4,6% e 9,3%.

As variações nas porcentagens de SST da polpa de guabijuzeiro é encontrada também em outras mirtáceas, mas com uma variação mais baixa entre os resultados como Lira *et al.* (2007), avaliando pitangueiras cultivadas em diferentes regiões do Brasil, onde encontraram variação de 8 % a 12% de SST. Ou Lopes (2009), estudando os SST de três mirtáceas nativas nos anos de 2006 a 2008, observou que para a cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* D.C) variou de 8 % a 10 %, para pitangueira (*E. uniflora* L.) de 10,60% a 11,8% e para grumixameira (*E. brasiliensis* Lam.) de 11 % a 17 %.

Quanto à acidez total titulável (ATT) para todas as procedências, tanto na polpa quanto na casca, foram observados níveis muito baixos, destacando os

frutos coletados em um dos acessos de Porto Alegre (PoA 2), que apresentaram acidez da polpa de 0,07% e da casca de 0,14% de ácido cítrico por 100g de polpa. Nas demais variou de 0,16% a 0,19% para polpa e 0,16% a 0,27% para a casca dos frutos (Tabela 1).

Os resultados indicam que o guabijuzeiro tem baixa acidez quando comparado a outras mirtáceas como a pitangueira (do tipo vermelha), onde Santos *et al.* (2002), encontraram ATT com valores entre 0,86% e 1,58% de ácido cítrico por 100 g de polpa, e a goiabeira, onde Argenta *et al.* (1995), encontraram uma ATT em goiabas maduras, variando de 0,40 a 1,04%.

TABELA 1. Características físico-químicas de frutos de guabijuzeiro de três locais de coleta. Acidez total titulável (ATT), sólidos solúveis totais (SST), relação entre SST e ATT (SST/ATT), pH da polpa e da casca (pH), vitamina C (AA) da polpa e diâmetro dos frutos. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Determinações	Locais		
	PoA 1	PoA 2	Maquiné
Polpa			
Sólidos solúveis Totais (SST %) - Brix°	23,6	8,9	17,4
Acidez Total Titulável - ATT (% ácido cítrico)	0,19	0,07	0,16
Relação SST/ATT	124	127	109
Vitamina C total (mg/100 g)	0	0	13,77
pH	4,7	4,68	4,03
Casca			
Sólidos solúveis Totais (SST %) - Brix°	8,9	4,6	9,3
Acidez Total Titulável - ATT (% ácido cítrico)	0,16	0,14	0,27
Relação SST/ATT	53	33	34
pH	4,46	4,49	4,31

A relação entre SST/ATT foi elevada em todos os frutos das plantas analisadas, principalmente da polpa, ficando entre 109 e 127, já para a casca a relação ficou entre 33 a 53 (Tabela1). Este índice elevado (relação SST/ATT)

se deve a baixa acidez que os frutos possuem, quando comparados a frutos de outras mirtáceas (Santos *et al.*, 2002; Argenta *et al.*, 1995; Yaselga *et al.*, 1977).

O aumento da relação SST/ATT com a maturação aponta para uma fruta de sabor doce quando madura. A relação sólidos solúveis totais/acidez titulável é considerada um índice de maturação das goiabeiras e pode variar de 3,85 a 25,14 dependendo do estágio de maturação (Yaselga *et al.*, 1977).

O pH da polpa ficou entre 4 e 4,7, e da casca entre 4,31 e 4,46. Segundo Gomes (2007), o pH próximo a 4 é desejável para utilização industrial, pois propicia uma maior resistência à contaminação microbiana.

A vitamina C somente foi detectada em apenas uma das procedências (PoA 2) de frutos, sendo de 13,67 mg/100g de polpa (Tabela 1). Este é um valor considerado baixo se comparado com outras mirtáceas nativas. Um exemplo é o camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh), que segundo Pinedo *et al.* (2004), observaram concentrações de vitamina C entre 800 mg a 3000 mg por 100 g de polpa, podendo atingir níveis muito mais altos em plantas excepcionais.

Valores superiores de vitamina C foram encontrados por Vallilo *et al.*, (2006), com valores em torno de 33 mg por 100g de polpa de vitamina C nos frutos do cambuci (*Campomanesia phaea*), já para goiabeira os valores variaram de 40 a 80 mg por 100g de polpa de vitamina C. No trabalho de Lopes (2009), foram encontrados valores de 56,59, 94,29 e 54,89 mg por 100g de polpa de vitamina C para os frutos de cerejeira do mato, de grumixameira e de pitangueira, respectivamente.

O teor de vitamina C pode diferir entre plantas de regiões diferentes, devido à alta variabilidade genética e interações com as condições do meio. Os frutos

de guabijuzeiro neste trabalho são provenientes de locais diferentes e sendo plantas propagadas por semente são geneticamente diferentes entre si, o que explica a diferença nos resultados em relação à presença de vitamina C entre as procedências. A influência dos fatores genéticos e ambientais na presença e quantidade de vitamina C presente nos frutos foram observados em pitangueira (*E. uniflora*) onde estudos mostram que frutos cultivados em Jaboticabal/SP contém em torno de 22,87 mg por 100g de polpa de vitamina C e frutos cultivados na região Amazônica contém em torno de 14 mg por 100g de polpa de vitamina C (Lira *et al.*, 2007).

Além dos fatores genéticos e ambientais outros fatores influenciam na presença e quantidade de vitamina C presente em frutos, segundo Carvalho & Guerra (1995), a composição dos frutos dependem também de fatores tais como tratos culturais e estágio de maturação, entre outros, podendo inclusive ser modificada pelo processamento e armazenamento, condições que vão interferir no conteúdo de vitamina C.

Santos *et al.*, (2002), estudando alterações fisiológicas durante a maturação de pitangueira, observaram que as frutas avaliadas apresentaram conteúdos relativamente altos de vitamina C variando de 21,85 a 55,0mg por 100g de polpa, sendo que os frutos de ambos os tipos apresentaram a maior concentração de vitamina C no final do crescimento, no estágio em que os frutos apresentavam coloração predominantemente vermelho e roxo, esse conteúdo decresceu conforme os frutos completavam seu amadurecimento.

O diâmetro médio dos frutos de guabijuzeiro foi de 15,71mm para os frutos de Maquiné e 19,38mm do acesso PoA 1. Nas mesmas plantas, foram observados frutos de diversos tamanhos dentro do mesmo lote (Figura 9).



FIGURA 9. Diferentes tamanhos de frutos de guabijueiro provenientes de uma planta localizada em Porto Alegre (PoA1). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Atualmente não há padrões estabelecidos para a comercialização do guabijueiro, sendo seus frutos tradicionalmente comercializados em feiras, mas para algumas frutíferas nativas da família das mirtáceas já existem padrões estabelecidos para a comercialização da polpa dos frutos. Um exemplo é a pitangueira onde o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1999), estabeleceu os seguintes valores de padrões referentes às características físico-químicas à industrialização da polpa: SST de 6 brix° (mínimo); acidez total de 0,92% de ácido cítrico (mínimo); pH entre 2,5 e 3,4, polpa de cor vermelha, sabor e aroma próprios (Lira *et al.*, 2007).

4.2 Propagação vegetativa

4.2.1 Propagação de guabijuzeiro por estaquia

Em ambos os experimentos (fevereiro/2009 e outubro/2009) houve enraizamento, independentemente das doses de AIB (0, 2, 4 e 6 g.L⁻¹) e da presença de vitamina C (3 g.L⁻¹) (Figura 10 e 11).

Houve diferença na porcentagem de enraizamento em função das épocas do ano. Os melhores resultados foram obtidos com estacas coletadas em fevereiro de 2009 com 35% de enraizamento. As estacas coletadas em outubro de 2009 apresentaram apenas 11% de enraizamento (Tabela 2). Estes resultados demonstram que a época do ano tem uma importante influência no desenvolvimento das raízes para esta espécie.

Resultados semelhantes foram encontrados por Norberto *et al.* (2001), estudando o enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica*) observaram que o enraizamento é afetado pela época de coleta das estacas, e as estaquias mais precoces (abril/maio) permitem a obtenção dos maiores percentuais de enraizamento.

A época do ano está estreitamente relacionada com a consistência da estaca, a quantidade de compostos fenólicos presentes na estaca e também as condições climáticas, especialmente no que se refere à temperatura e a disponibilidade de água.

Além da época do ano outros fatores afetam a resposta das estacas ao enraizamento, tais como: tipo de estaca, número de folhas deixadas nas estacas, tipos e doses de reguladores de crescimento utilizado, tipo de substrato, as condições inerentes ao ambiente da casa de vegetação, a

genética do material em estudo com relação ao potencial destas em formar raízes, a liberação de compostos fenólicos que provocam a oxidação na região do corte dos tecidos, entre outros fatores (Lopes, 2009).

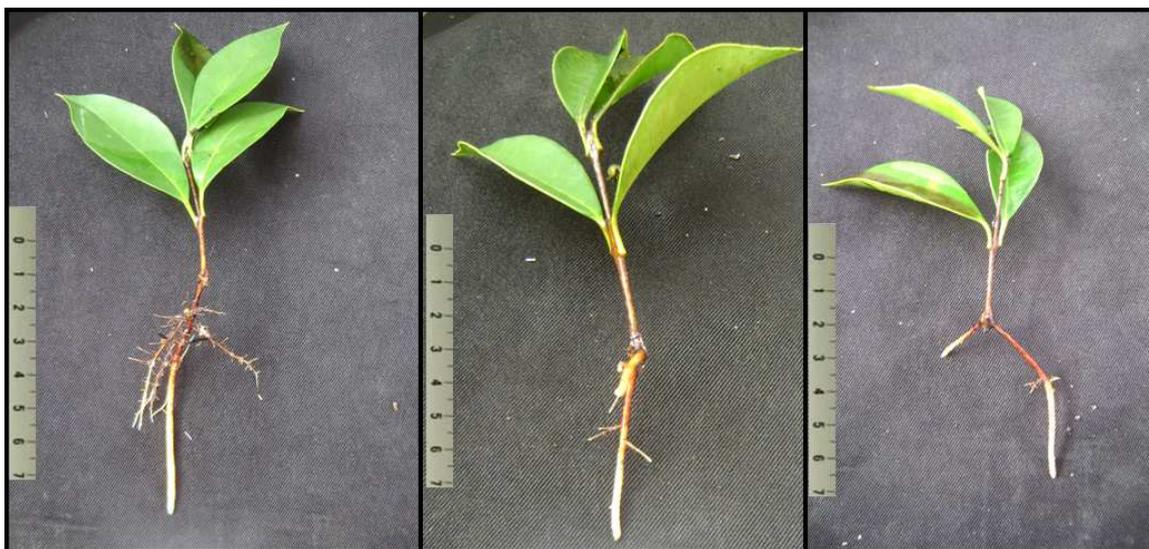


FIGURA 10. Estacas de guabijuzeiro enraizadas após 120 dias, coletadas em fevereiro de 2009, na FEPAGRO em Viamão, RS. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.



FIGURA 11. Estacas de guabijuzeiro enraizadas após 120 dias, coletadas em outubro de 2009, na FEPAGRO em Viamão, RS. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

TABELA 2. Porcentagem de retenção foliar, calos, raízes e número médio de raízes por estacas apicais de guabijuzeiro em diferentes concentrações de AIB, cultivadas em duas épocas do ano (fevereiro e outubro). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Doses g.L ⁻¹	Retenção Foliar (%)		Calos(%)		Raízes(%)		Nº raízes/estacas	
	Fevereiro	Outubro	Fevereiro	Outubro	Fevereiro	Outubro	Fevereiro	Outubro
0	33	43	58	58	25	7,5	1	0,5
2	48	40	28	48	50	10	1,91	2,5
4	35	28	43	28	38	15	1	1,8
6	35	35	40	43	28	15	0,65	3,5
vit C	43	43	45	55	33	7,5	1,76	0,5
Médias	39	38	43	46	35 a	11 b	1,3	1,8
Estação	0,831		0,685		<0,001		0,707	
Dose	0,746		0,287		0,556		0,642	
Estação x dose	0,923		0,588		0,568		0,215	
CV (%)	7,7 (ns)		7,8 (ns)		6,9		79 (ns)	
Transformação	$\sqrt{x+1}$		$\sqrt{x+1}$		$\sqrt{x+1}$		\sqrt{x}	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Entre os diversos fatores que podem ter influenciado nos resultados de enraizamento do presente trabalho destacam-se fatores fisiológicos e as temperaturas ocorridas nos meses em que ambos experimentos foram conduzidos. No mês de fevereiro o guabijuzeiro de onde foram retiradas as estacas se encontrava em fase de frutificação e desenvolvimento vegetativo. Neste estágio, os tecidos vegetais apresentam alta atividade meristemática e baixo grau de lignificação. Já em outubro, em função da diferença das condições climáticas, os tecidos estavam mais lignificados.

Nos primeiros dois meses do experimento realizado em fevereiro as médias das temperaturas máximas passaram dos 40°C e as mínimas não foram superiores a 23°C. Apenas nos últimos dois meses (abril e maio) as temperaturas ficaram mais amenas (Figura 12A). Já no experimento realizado em outubro as médias das temperaturas máximas foram de 36,8 °C e das mínimas de 18,5 °C em todo o período do experimento (Figura 12B). Conforme

Fachinello *et al.* (1995) as condições ambientais estão estreitamente relacionadas com a época do ano, afetando fortemente o potencial de formação de raízes em estacas.

Embora o enraizamento em ambos os experimentos tenha apresentado percentuais relativamente baixos, pode-se inferir que, para guabijuzeiro, pode representar um bom resultado, pois, segundo Franzon (2004), em geral, plantas frutíferas lenhosas, como certas espécies da família mirtácea, apresentam dificuldade de enraizamento.

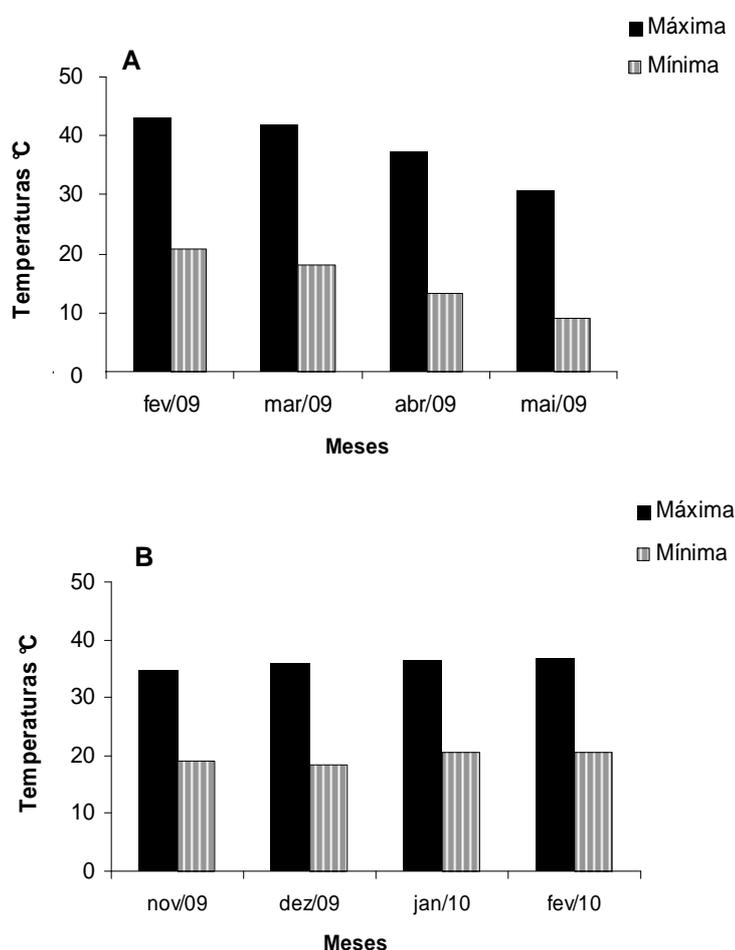


FIGURA 12. Médias de temperatura máximas e mínimas da casa de vegetação com nebulização intermitente. (A) estaquia realizada em fevereiro/2009 (B) estaquia realizada em outubro/2009. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Em guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.), Scutti (1999), testando diferentes substratos e tratamentos para indução de enraizamento em estacas semilenhosas e herbáceas, não obteve enraizamento em nenhum dos tratamentos.

Franzon *et al.* (2004), estudando o efeito do AIB em diferentes tipos de estacas de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*), observaram fitotoxidez por AIB em estacas herbáceas, em concentrações a partir de 4 g.L⁻¹, e baixo percentual de calo em estacas herbáceas.

Lopes (2009), testando diferentes tipos de estacas semilenhosas (apical, mediana e basal) nas espécies de cerejeira-do-mato, pitangueira e grumixameira em dezembro 2006, observou que não houve enraizamento independentemente da dose de AIB utilizada (0, 1, 2 e 4 g.L⁻¹). Neste mesmo estudo em janeiro 2008 testando estacas medianas semilenhosas das mesmas espécies os resultados demonstraram que as grumixameiras tratadas com AIB nas doses de 0,5 e 1 g.L⁻¹ apresentaram enraizamento (6,67 %), as demais espécies não apresentaram a formação de raízes independente da dose de AIB utilizada.

As plantas lenhosas, principalmente as pertencentes à família das mirtáceas, são ricas em compostos fenólicos, quando estes compostos são liberados provocam a oxidação dos tecidos e prejudicam o desenvolvimento das raízes. Algumas substâncias podem ser utilizadas para diminuir a oxidação que ocorre na base de algumas estacas em função da liberação destes fenóis após o corte das estacas. A vitamina C, por ser um antioxidante, pode ser utilizado para esta finalidade, tanto isoladamente, quanto em associação com

outras substâncias. No entanto, a utilização da vitamina C não diferiu dos demais tratamentos utilizados, para o enraizamento das estacas (Tabela 2).

No trabalho de Soares *et al.* (2008), foram observados a influência do antioxidante ácido ascórbico como cofator de enraizamento, do floroglucinol como um segundo cofator e do ácido indolbutírico como fitorregulador, sobre o enraizamento de estacas semi-lenhosas de cerejeira-do-rio-grande (*E. involucrata* DC.). Não obteve enraizamento, mas os autores concluíram que a utilização do ácido ascórbico como cofator de enraizamento aumenta a eficiência do floroglucinol e do fitorregulador ácido indolbutírico (AIB), evidenciado pela formação de calos nas estacas.

Em relação às condições ambientais da casa de vegetação, no experimento realizado em fevereiro de 2009 a umidade relativa do ar (%) ficou em torno de 100 %, mas em alguns períodos foi reduzida (Figura 12). Esta redução ocorreu nos períodos entre os ciclos de irrigação da nebulização, e quando estes coincidiram com temperaturas elevadas. Este fator pode ter desidratado algumas estacas e, conseqüentemente, colaborado para o baixo percentual de enraizamento. Pois, segundo Fachinello (1995), para que haja divisão celular, é necessário que as células se mantenham túrgidas. A perda de água em uma estaca é muito grande, seja através das folhas ou das brotações em desenvolvimento, especialmente considerando o período em que não há raízes formadas. Segundo este mesmo autor a perda de água é uma das principais causas da morte em estacas.

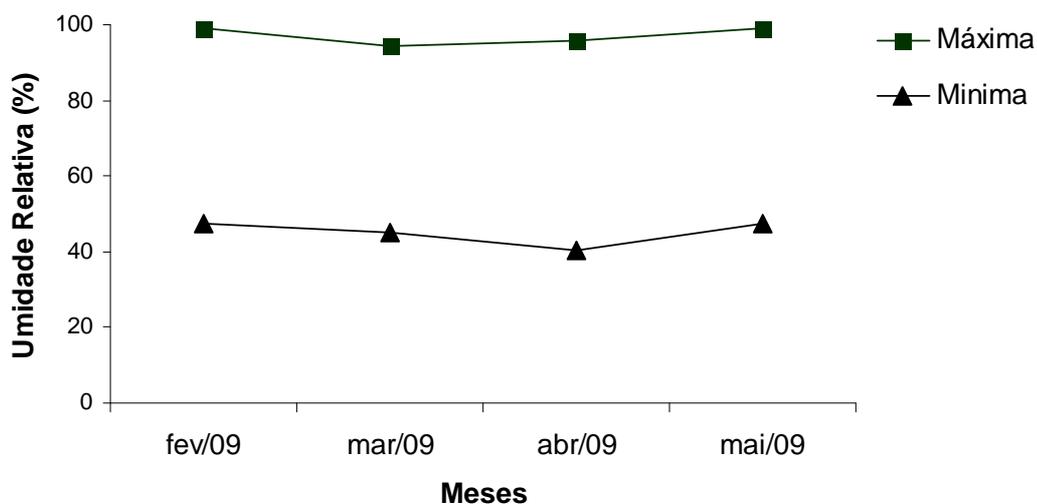


FIGURA 13. Médias de umidade relativa do ar da casa de vegetação com nebulização intermitente nos meses de fevereiro a maio de 2009. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

A porcentagem de retenção foliar não apresentou diferença em relação às doses de AIB e vitamina C aplicada na base das estacas. Não houve diferença entre as épocas do ano, ficando a média em torno de 39% (Tabela 2).

Houve presença de calos nas estacas de todos os tratamentos utilizados, indiferentemente às doses de AIB e a época do ano (Figura 14).

Segundo Fachinello *et al.* (1995), a formação dos calos, muitas vezes é resultado do corte feito na base das estacas e, apesar de ser um processo independente ao enraizamento pode dar indícios de ocorrência deste evento.

Nas estacas enraizadas a média do número de raízes por estaca em fevereiro foi de 1,3 e outubro de 1,8, não havendo diferenças nos tratamentos.

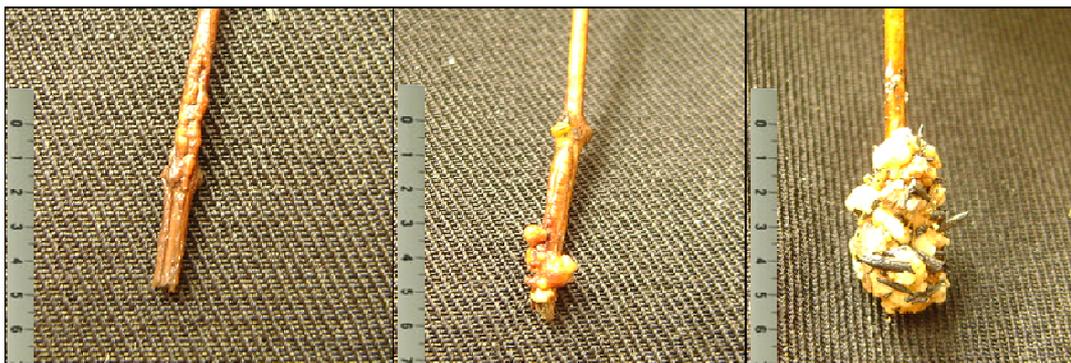


FIGURA 14. Estacas de guabijuzeiro após 120 dias, com calos de diferentes tamanhos na base. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

A estatística mostrou uma correlação positiva entre a presença de folhas e raízes nas estacas coletadas e cultivadas em fevereiro (Coeficiente de correlação 0,806 e $P = <0,001$) e outubro (Coeficiente de correlação 0,584 e $P = <0,017$) e uma correlação positiva entre a presença de folhas e calos nas estacas cultivadas em outubro (Coeficiente de correlação 0,8 e $P = <0,0001$). As estacas que perderam as folhas durante o experimento morreram, já as estacas que mantiveram as folhas ao final do experimento (120 dias) apresentaram calos ou enraizamento. Estes resultados demonstraram que a presença de folhas nas estacas é um fator importante para o processo de enraizamento desta espécie.

Segundo Costa Junior (2000) e Oliveira (2000), a presença de folhas no enraizamento de estacas contribuem favoravelmente no processo de formação das raízes, auxiliando no transporte de substâncias promotoras de enraizamento. Contudo a presença de folhas favorece a perda de água por transpiração.

Franzon *et al.* (2004), estudando a goiabeira-serrana, verificaram que a queda de folhas influenciou negativamente na porcentagem de sobrevivência das estacas.

Santarosa *et al.* (2008), estudaram o enraizamento de estacas de *M. pungens* e não obtiveram sucesso no enraizamento da espécie, contudo observaram que a presença de folhas e a aplicação de AIB aceleraram a formação de calos na base das estacas.

Nos dois experimentos, as estacas enraizadas foram transferidas para sacos de polietileno pretos (5L) contendo substrato comercial (Rendimax®) e mantidos em casa de vegetação sem nebulização intermitente, as mudas eram irrigadas quando necessário. Após quatro meses da transferência para os sacos com substrato comercial, foram observadas brotações em diversas mudas provenientes do experimento de estaquia instalado em fevereiro de 2009. Observou-se também, uma sobrevivência de 84% destas mudas, após dez meses da estaquia (Figura 15).



FIGURA 15. (A) Mudanças de estacas de guabijuzeiro coletadas e cultivadas em fevereiro de 2009, após dez meses da estaquia; (B) Detalhe das mudas provenientes do experimento realizado em fevereiro de 2009, dez meses após a estaquia. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

4.2.2 Propagação de guabijuzeiro por enxertia de garfagem

Os dados obtidos mostram compatibilidade entre enxerto e porta-enxerto de guabijuzeiro (Figura 16).



FIGURA 16. (A) Início das brotações após trinta dias da enxertia em enxerto e porta-enxerto de guabijuzeiro de caule lenhoso; (B) detalhe das brotações de guabijuzeiro após 45 dias da enxertia. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Segundo Hartmann *et al.* (1990), entende-se por compatibilidade de enxertos, a existência de uma união bem sucedida e um desenvolvimento satisfatório na composição de uma planta, obtida pelo processo de enxertia.

A eficiência da enxertia (porcentagem de enxertos viáveis) em porta-enxertos com idades e estágio de desenvolvimento diferente foi baixa (Experimento 1), havendo diferenças entre os tratamentos (Figura 17).

A maior porcentagem de enxertos viáveis obteve-se nos porta-enxertos mais velhos com caule mais lignificado. Neste tratamento os enxertos foram protegidos por sacos plásticos e isto pode ter sido um fator favorável, pois propiciou a formação de uma câmara úmida em volta do enxerto diminuindo a

possibilidade de desidratação dos tecidos enxertados. O que corrobora com os resultados obtidos por Neto *et al.* (1996), que observaram maior eficiência da enxertia em mudas produzidas em telado e com a proteção de sacos plásticos transparentes em enxertos de aceroleira.

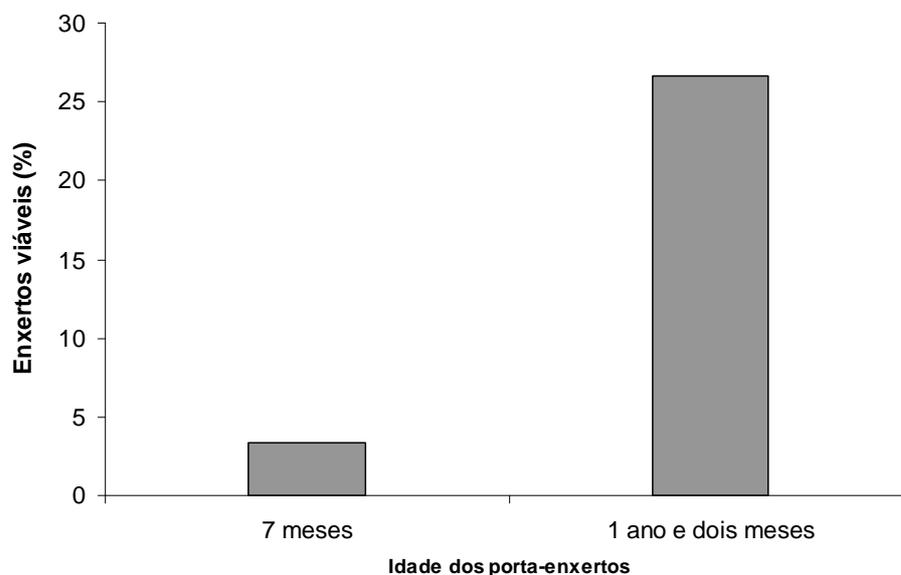


FIGURA 17. Porcentagem de enxertos viáveis após enxertia de garfagem em porta-enxerto de guabijuzeiro com idades diferentes. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Nos porta-enxertos mais novos o caule estava em estágio semilenhoso, dificultando a execução da enxertia e conseqüentemente expondo por mais tempo os tecidos ao ambiente, o que pode aumentar a reação de oxidação dos compostos fenólicos. Estes compostos, especialmente nas espécies da família das mirtáceas, quando em contato com o ar, resultam em maior oxidação dos tecidos, dificultando a formação do calo, e da cicatrização (Fachinello *et al.*, 2005).

O fator genético também pode ter influenciado nos resultados de enxertia do guabijuzeiro. Resultados de Bezerra *et al.* (2002), mostram a influencia do fator genético em estudo com dez genótipos de pitangueira, os

resultados demonstraram que houve diferença no comportamento entre as diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto.

Da mesma forma Franzon (2008), estudando enxertia de garfagem em diferentes seleções de pitangueira, encontrou diferenças significativas para os percentuais de brotações (45% a 95%) e pegamento (40% a 87,5%) entre as distintas seleções de pitangueira.

No Experimento 2 de enxertia constata-se que os porta-enxertos com diâmetros Médio (3,19 a 4,23 mm) e Grande (4,38 a 6,90 mm), ambos com caule lenhoso obtiveram maior eficiência na enxertia em relação ao porta-enxerto com diâmetro Pequeno (2,14 a 3,18 mm) e caule semilenhoso. Esta relação ocorreu também na variável número de brotações por enxerto (Tabela 3). Confirmando os resultados do experimento anterior.

O diâmetro do porta-enxerto é um dos fatores de grande influência na eficiência dos enxertos. Segundo Bezerra *et al.* (1999), independentemente do processo de enxertia realizado, a idade dos porta-enxertos influi na eficiência da enxertia.

Em relação ao diâmetro do porta-enxerto, Espíndola *et al.* (2004), verificaram que obtêm-se melhores resultados em umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) quando a enxertia é realizada sobre porta-enxerto de maior diâmetro, além de facilitar a realização da técnica. Resultado semelhante foi observado por Gomes *et al.* (2008), onde o maior diâmetro de porta-enxerto possibilitou maior eficiência da enxertia nas garfagens inglês simples e fenda cheia em umbuzeiro.

Bezerra *et al.* (1999), observaram em seus estudos com pitangueira que os métodos de enxertia por garfagem no topo de fenda cheia ou a inglês

simples, em porta enxertos com 9 e 12 meses de idade foram eficientes, com 77,5 % de pega.

TABELA 3. Porcentagem de enxertos viáveis (ou pegamento) e número de brotações por enxerto em porta-enxertos de guabijuzeiro com diâmetros diferentes (Pequeno, Médio e Grande). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Diâmetro	Enxertos viáveis (%)	Nº brot /enxerto (médi a)
Pequeno (2,14 a 3,18 mm)	2,5 b	0,5 b
Médio (3,19 a 4,23 mm)	30 a	4,5 a
Grande (4,38 a 6,9 mm)	35 a	4 a
PrP>F	<0,001	<0,001
CV(%)	25,8	28,7

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram transformados em \sqrt{x}

O baixo percentual de enxertos viáveis pode ter ocorrido devido a vários fatores, entre eles os fatores climáticos, fisiológicos, a época em que foi realizada a enxertia, características dos ramos, métodos e técnicas utilizadas.

Franzon (2008), estudando a propagação vegetativa de pitangueira pelo método de enxertia de garfagem no topo em fenda cheia e em dupla fenda, nos meses de julho, agosto e setembro, relatou que os melhores resultados foram encontrados com a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia (60%), sendo o mês de setembro a época mais propícia para a realização da enxertia em pitangueira. Neste mesmo trabalho o autor testou diferentes espécies de mirtáceas como porta-enxerto, sendo elas: pitangueira, uvaieira (*Eugenia pyriformis*) e guabijuzeiro, nos meses de setembro e outubro. Como resultados, o porta-enxerto de uvaieira foi praticamente nulo (1,3% de pegamento)

diferindo dos demais porta-enxertos: 28,8% para pitangueira e 41,3% para guabijuzeiro, não diferindo em relação à época em que foram enxertados.

Lopes (2009), estudando a propagação vegetativa via enxertia de cerejeira-do-mato, pitangueira e grumixameira, relatou que dentre os processos de enxertia testados (garfagem de fenda cheia e borbulhia em 'T' invertido), a enxertia de topo por garfagem de fenda cheia apresenta maior potencial para as três espécies de mirtáceas estudadas. Neste mesmo estudo foram testados diferentes porta-enxertos para as espécies. Os resultados mostraram que somente houve compatibilidade na enxertia quando o porta-enxerto e o garfo são da mesma espécie.

Suguino *et al.* (2003), estudaram a propagação vegetativa de camu-camu (*Myrciaria dubia* (Humb., Bonpl. & Kunth) McVaugh). Nesse trabalho foram utilizados como porta-enxerto as espécies de camu-camu, pitangueira e de goiabeira, e quatro tipos de enxertia (garfagem no topo de fenda cheia, em fenda lateral, em inglês simples e de colo). Os autores concluíram que apenas o porta-enxerto camu-camu mostrou-se compatível, havendo incompatibilidade com os demais porta-enxertos. Entre os métodos utilizados para propagação a garfagem em fenda lateral se mostrou mais eficiente.

4.2.3 Micropropagação

4.2.3.1 Experimento 1: Efeito do hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes *in vitro* de guabijuzeiro

Logo após a coleta, as sementes apresentaram teor de água de 38,7%. Este valor elevado no estágio de maturação é característico de espécies recalcitrantes, e estão de acordo com resultados encontrados por Andrade (2002), que classificou as sementes de *M. pungens* como intolerantes à dessecação.

A maior porcentagem de contaminação (100%) foi verificada com 0% de hipoclorito de sódio (Tabela 4 e Figura 18). Nos demais tratamentos houve uma baixa contaminação (entre 2% e 14%), não apresentando diferenças significativas entre as concentrações de hipoclorito de sódio (Tabela 4).

TABELA 4. Porcentagem de contaminação, germinação e vigor calculado pelo tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVGM) de sementes de guabijuzeiro logo após a coleta e semeadas em meio de cultura WPM. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009

Trat. (Conc. NaOCl)	Contaminação	Germinação (%)	TMG (dias)	IVGM
0	100 b	0	c	-
2	14 a	68	b	19,1
4	6 a	98	a	17,2
6	2 a	92	a	17,2
8	6 a	91	a	18,2
Valor P	<0,001	<0,001	0,207	0,7128
CV (%)	17	8,3	7,6	8,7

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram transformados em \sqrt{x} .



FIGURA 18. Sementes de guabijuzeiro contaminadas por microrganismos, inoculadas *in vitro* em meio WPM sem fitoreguladores. (tratamento: 0% de hipoclorito de sódio). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Os resultados demonstraram que as sementes não germinaram no tratamento sem hipoclorito de sódio, provavelmente devido à alta contaminação por microrganismos. Nos demais tratamentos ocorreram germinação havendo diferença entre os tratamentos (Tabela 4 e Figura 19).



FIGURA 19. Germinação *in vitro* de sementes de guabijuzeiro tratadas com hipoclorito de sódio inoculadas em meio WPM. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Resultados diferentes foram encontrados por Kalil Filho (2000), estudando a desinfestação com hipoclorito de sódio das sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*), observaram que mesmo quando as sementes apresentavam contaminação por microrganismos ocorria germinação.

Sementes desinfestadas com 2% de hipoclorito de sódio apresentaram 68% de germinação, sendo inferior aos demais. Os tratamentos com 4% (98%), 6% (92%) e 8% (91%) de hipoclorito de sódio, não diferiram significativamente quanto à porcentagem de germinação (Tabela 4).

Resultados semelhantes foram encontrados por Picolotto *et al.* (2007), concluíram que o hipoclorito de sódio a 5% é eficiente como desinfestante na contaminação fúngica de jabuticabeira (*Myrciaria spp.*), proporcionando redução nas taxas de contaminação.

Assim como constatado neste trabalho, em sementes de *Pinus banksiana* Hanrry & Thorpe (1994) obtiveram bons resultados com desinfestação com concentrações de hipoclorito de sódio de 6%, com 20 minutos de exposição.

As concentrações de cloro ativo não afetaram o vigor das sementes mensurado pelo TMG (dias) e IVGM de sementes de guabijuzeiro (Tabela 4).

Segundo Hisião *et al*, (1981), em virtude da concentração e do tempo de exposição das sementes, o hipoclorito de sódio, pode funcionar como um promotor da germinação e da quebra de dormência. Isto indica que esta substância pode não só escarificar o tegumento, aumentando sua permeabilidade à água, oxigênio e a solutos, como também, facilitar a remoção ou oxidação de inibidores de germinação. Isso pode explicar o fato dos tratamentos com 4%, 6% e 8% de hipoclorito de sódio apresentarem germinação superior ao tratamento com 2% de hipoclorito de sódio. Dentre as concentrações testadas provavelmente as concentrações de cloro ativo, aumentaram a permeabilidade do tegumento das sementes de guabijuzeiro promovendo maior germinação (Figura 20).

Os resultados demonstram uma tendência a diminuir a porcentagem de germinação na concentração de 6% de hipoclorito de sódio, possivelmente concentrações acima de 8% poderiam ser fitotóxicas, prejudicando a germinação. Contudo, o controle de microrganismos foi eficiente nas concentrações de 2 a 8% de hipoclorito de sódio.

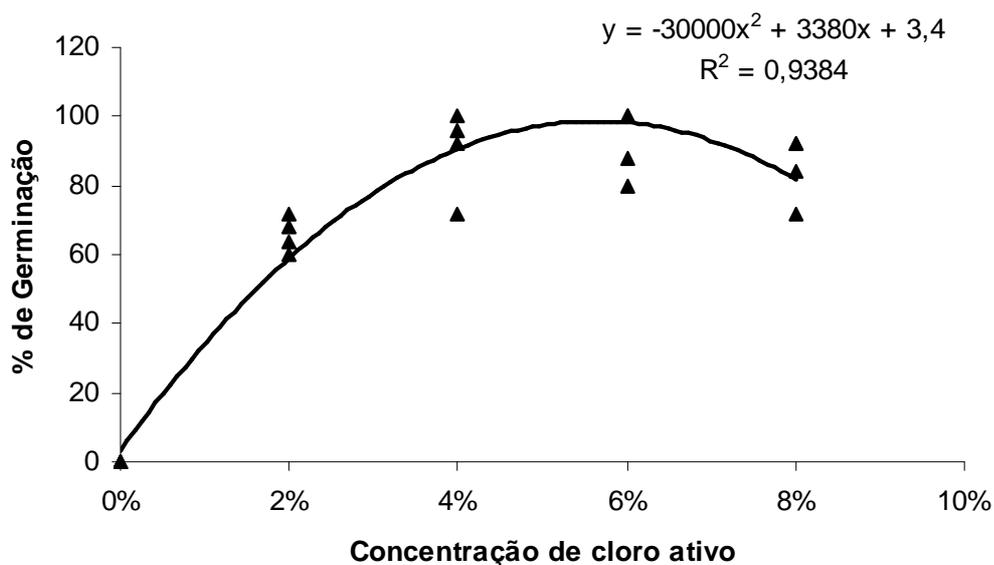


FIGURA 20. Porcentagem de germinação de sementes de guabijuzeiro em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Porto Alegre, RS, 2009.

4.2.3.2 Experimento 2: Efeito do BAP na multiplicação *in vitro* de segmentos apicais de plântulas de guabijuzeiro

A porcentagem de brotações e número de folhas por explante foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos utilizados (Tabela 5).

Em todos os tratamentos foram produzidas brotações (Figura 21). As concentrações 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mg.L⁻¹ de BAP, não diferiram estatisticamente da Testemunha (sem adição de BAP), apenas a concentração de 2 mg.L⁻¹ de BAP foi diferente apresentando porcentagem de brotações inferiores aos demais tratamentos que variaram de 13 a 25% de brotações (Tabela 5).

TABELA 5. Porcentagem de brotação e oxidação de explantes, número médio de folhas, altura e número de brotações por explante de guabijuzeiro cultivados em meio de cultura WPM com sete concentrações de BAP (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 e 2 mg.L⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Tratamentos	Brotação (%)	Oxidação (%)	Nºfolhas	Altura (mm)	Nºbrot/expl
0	13 a	18	1,25 b	0,15	0,86
0,2	24 a	6	2,12 a	0,19	0,97
0,4	25 a	7	2,81 a	0,28	1,09
0,6	15 a	8	2,12 a	0,28	1,25
0,8	13 a	17	1,65 a	0,33	0,87
1	14 a	16	1,36 b	0,17	0,75
2	8 b	22	0,83 b	0,15	0,42
CV(%)	2,02	2,11	6,06	1,29	2,95
PrP>F	<0,039	0,049	<0,039	0,377	0,064

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. * Todos os dados foram transformados em $\sqrt{x+5}$.

Resultados diferentes foram relatados por Nascimento *et al.* (2008), avaliando a influencia do BAP na micropropagação de uvaieira, observaram maior número e comprimento de brotações, folhas e gemas por explante na concentração de 1 mg.L⁻¹ de BAP.



FIGURA 21. Desenvolvimento de brotações de guabijuzeiro *in vitro*, em meio WPM com 0,4 mg.L⁻¹ de BAP. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Souza *et al.* (2008), estudando a multiplicação *in vitro* de pitangueira, avaliaram diferentes tipos (BAP; 2iP; zeatina) e concentrações 0; 1,12 e 2,25 mg.L⁻¹ (0; 5 e 10 µM) de citocininas em meio WPM. Os autores concluíram que, para a multiplicação *in vitro* de pitangueira a concentração de 1,12 mg.L⁻¹ BAP é eficiente e tem menor custo.

Soares *et al.* (2007), observaram que no cultivo *in vitro* de explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) inoculados em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg.L⁻¹) houve a formação de brotações em todos os tratamentos testados, entretanto a maior média observada foi de quatro brotações para explantes cultivados na concentração de 5,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Souza (2007), trabalhando com multiplicação *in vitro* de goiabeira-serrana, araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e pitangueira em dois meios de cultura, MS e WPM, e adição da citocinina BAP na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ (2,2 µM) ou ausência desta citocinina. Observou que a variável número de brotações por explante não houve diferença entre o tipo de meio de cultura sem adição de BAP, mas verificaram que o meio WPM favoreceu o número de brotações quando foi adicionado 0,5 mg.L⁻¹ de BAP.

Pérez-Tornero *et al.* (2000), verificaram que as concentrações de 0,4 e 0,6 mg.L⁻¹ de BAP possibilitaram os melhores resultados na multiplicação *in vitro* de *Prunus armeniaca* L.

Uematsu *et al.* (1999), propagaram a pitangueira utilizando brotações recentemente alongadas em meio MS. Observaram que o meio de cultura suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ BAP foi adequado para a regeneração e proliferação de brotações.

No presente trabalho o número de folhas por explantes nos tratamentos com concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg.L⁻¹ de BAP foram superiores aos demais tratamentos, com um número médio de folhas entre 1,65 e 2,81, não apresentando diferenças estatísticas entre estes. Os tratamentos com concentrações de 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP e Testemunha (sem adição de hormônio), que apresentaram menor número de folhas não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

A oxidação variou entre 6 e 22% e a altura das brotações entre 0,15 e 0,33 cm, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 5).

Resultados diferentes foram relatados por Rogalski *et al.* (2003), onde a utilização de BAP em concentrações maiores que 0,5 mg.L⁻¹ reduziram a altura dos brotos de ameixeira 'Santa Rosa' (*Prunus salicina* Lindl.) *in vitro* na fase de multiplicação.

Horbach (2008), estudando propagação *in vitro* de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) observou que na fase de multiplicação a adição de BAP ao meio de cultura promoveu o aumento do número de brotos, de entrenós e de folhas, além de um aumento no comprimento dos brotos na dose de 2 mg L⁻¹, na ausência de BAP o número de brotos/explante foi de 1,1, enquanto nas concentrações de 2 mg L⁻¹ foram observados 7,0 brotos/explante.

4.2.3.3 Multiplicação de segmentos nodais e apicais de plântulas de guabijuzeiro

a) Experimento 3:

No experimento anterior foram testados diversas concentrações de BAP, neste experimento os tratamentos consistirão em uma concentração de BAP (0.4 mg.L) a qual se mostrou eficiente no experimento anterior, além da associação do BAP com ANA (0,4+0,04 mg.L⁻¹) com o objetivo de promover o enraizamento nesta fase da multiplicação e a testemunha sem adição de fitorregulador.

Os resultados do desenvolvimento de explantes de guabijuzeiro demonstraram desenvolvimento das brotações em todos os tratamentos testados, mesmo na ausência do regulador de crescimento (Figura 22). Entretanto o meio com BAP foi superior em todas as variáveis analisadas independente do segmento utilizado (Tabela 6).

Resultados semelhantes foram encontrados por Mantovani *et al.* (2001), onde a taxa de multiplicação e a altura das brotações de louro-pardo (*Cordia trichotoma*) foram superiores no meio com BAP se comparados com meio contendo combinação de ANA + BAP (1mg.L⁻¹ respectivamente).

Já Ali & Lüdders (2001), estudando *Psidium guajava* L., observaram maior taxa de multiplicação na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

A combinação de BAP+ANA foi superior à Testemunha (meio sem fitorregulador), promovendo o aumento da emissão de folhas, altura dos explantes e maior número de brotações por explante (Tabela 6).

TABELA 6. Desenvolvimento de explantes apicais e nodais de guabijuzeiro, na fase de multiplicação, após 30 dias em meio WPM acrescidos com BAP ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$), BAP+ANA ($0,4+0,04 \text{ mg L}^{-1}$) e Testemunha (sem adição de fitorregulador). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Tratamentos		Brotação (%)	Nºfolhas	Altura	Nºbrot/expl
Apical	Testemunha	18 c	2,33 c	0,23 c	0,5 c
	BAP	73 a	7,35 a	0,55 a	1,2 a
	BAP+ANA	57 b	5,58 b	0,46 b	0,8 b
Nodal	Testemunha	12 c	2,17 c	0,13 c	0,3 c
	BAP	80 a	11,63 a	0,82 a	1,6 a
	BAP+ANA	58 b	5,45 b	0,44 b	0,9 b
PrP>F	Explante	0,914	0,206	0,497	0,974
	Meio de cultura	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Explante x Meio de cultura	0,597	0,07	0,05	0,177
CV (%)		9,13	13,6	4,88	29,3

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha para meios de cultura, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste de Duncan. Os dados foram transformados em $\sqrt{x+5}$.

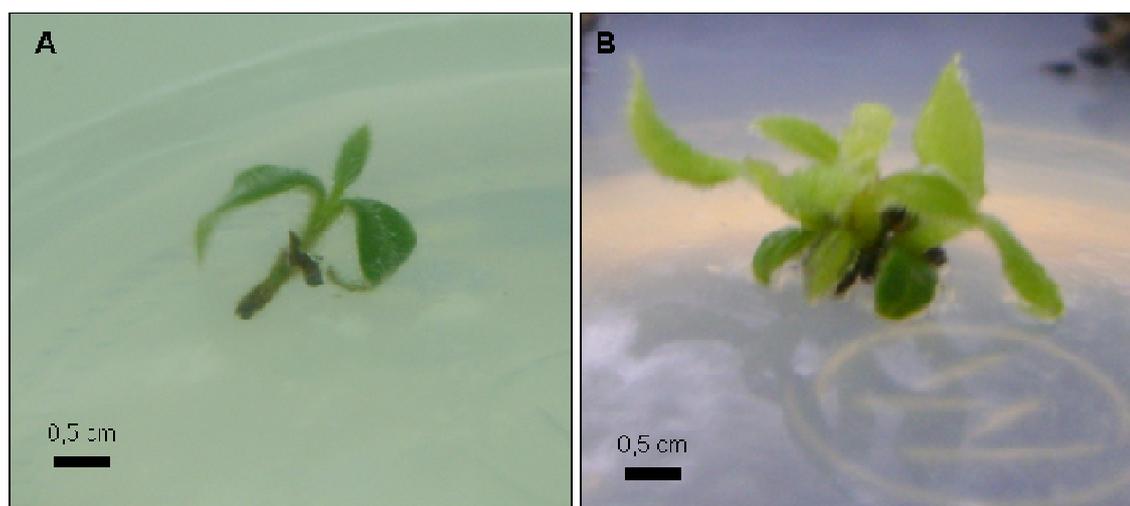


FIGURA 22. (A) Brotação de explante de guabijuzeiro inoculado em meio WPM acrescentado de BAP+ANA ($0,4+0,04 \text{ mg.L}^{-1}$); (B) Brotações de explante inoculado em meio WPM acrescentado de BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Martinotto (2004), encontrou uma combinação eficiente para a indução de brotações em segmentos nodais de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* D.C), nas concentrações de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA.

Em relação aos tipos de segmentos testados foi observado diferença apenas na variável oxidação (Figura 23). O segmento apical apresentou os

melhores resultados no meio de cultivo sem fitorregulador (Testemunha), com 16% de oxidação, e no meio com BAP+ANA com 2% de oxidação, no meio com BAP não teve diferença entre os segmentos utilizados, sendo que a oxidação ficou entre 2% e 3% (o meio de cultivo com BAP destacou-se com os menores níveis de oxidação).

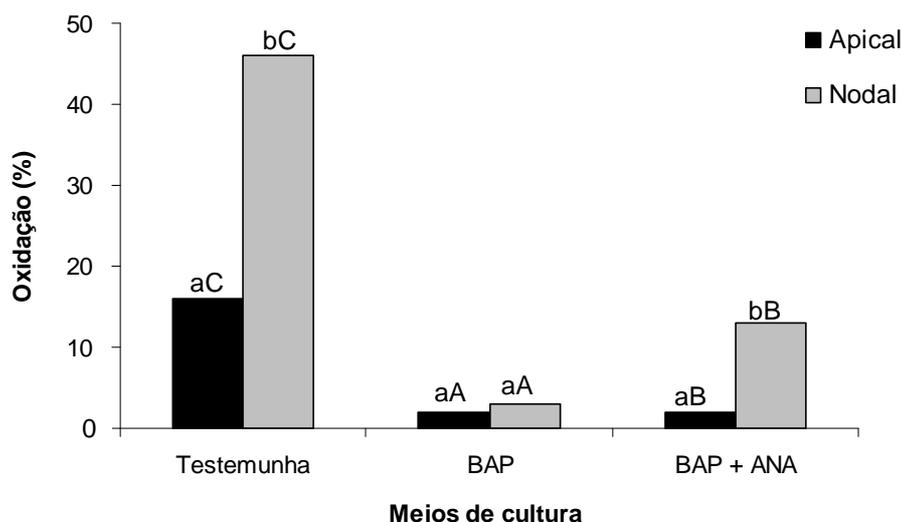


FIGURA 23. Porcentagem de oxidação de segmentos apicais e nodais de guabijuzeiro cultivados em meio de cultura WPM acrescentado de BAP ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$), BAP+ANA ($0,4+0,04 \text{ mg.L}^{-1}$) e Testemunha (sem adição de fitorregulador). (Mesma letra maiúscula para meios de cultura e minúscula para segmentos (apical e nodal) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Andrade *et al.* (2000), estudando a multiplicação de segmentos nodais e apicais de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) observaram que as combinações de ANA com KIN (cinetina) e BAP, tiveram pouca formação de brotos e os explantes tornavam-se necróticos, independentemente do segmento utilizado, contudo, neste mesmo trabalho os autores relatam que os segmentos nodais, de maneira geral, apresentaram maiores níveis de oxidação, principalmente no

meio contendo $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ($6,6 \text{ }\mu\text{M}$) de BAP, coincidindo com os resultados do presente estudo.

Da mesma forma Vieitez et al., (1980) em estudo de multiplicação de castanheiras (*Bertholletia excelsa* Kunth) relata as dificuldades em propagar a partir de explantes nodais, devido à oxidação que ocorre nesses segmentos.

b) Experimento 4: 1° subcultivo

Trinta dias após a inoculação do experimento anterior (Experimento 3), as brotações foram transferidas para novos meios cultura, realizando o primeiro subcultivo.

Nesta etapa não houve diferença entre o tipo de segmento utilizado no cultivo inicial (Experimento 3 – apical ou nodal), para as variáveis porcentagens de sobrevivência, oxidação e número de folhas das brotações (Tabela 7). Contudo houve diferenças entre o meio de cultivo utilizado, sendo o meio com BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$) superior em todas as variáveis avaliadas (Tabela 7). Estes resultados também foram observados no cultivo inicial, desta forma para esta espécie não há necessidade de utilizar a auxina (ANA) associada ao BAP na fase de multiplicação, pois apenas a citocinina já é eficiente.

No meio com BAP obteve-se alta sobrevivência neste primeiro subcultivo (Figura 24), ficando em torno de 90%. A oxidação foi baixa em torno de 9% e o número de folhas por explante foi alto ficando entre 17,6 e 18,3 por explante, sendo superior ao cultivo inicial.

TABELA 7. Porcentagem de sobrevivência, oxidação e número de folhas das brotações emitidas pelos segmentos de guabijuzeiro no 1º subcultivo, mantendo-se a identificação do tipo de explante utilizado no cultivo inicial (apical e nodal), na fase de multiplicação, após 30 dias em meio WPM acrescidos com BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$), BAP+ANA ($0,4+0,04 \text{ mg.L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009

Tratamentos		Sobrevivência (%)	Oxidação (%)	Nºfolhas
Apical	BAP+ANA	67 b	37 b	6,8 b
	BAP	90 a	9 a	17,6 a
Nodal	BAP+ANA	51 b	33 b	6,5 b
	BAP	89 a	9 a	18,3 a
PrP>F	Meio de cultura	<0,001	<0,002	<0,001
	Explante	0,269	0,965	0,895
	Explante x Meio de cultura	0,312	0,563	0,716
CV(%)		25,8	20,6	28,9

Médias seguidas pela mesma letra minúscula para meios de cultura, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram transformados em $\log(x+10)$.

O aumento da concentração de BAP no meio de cultivo de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ do cultivo inicial para $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ desta etapa mostrou-se eficiente, sendo possível a obtenção de mais brotações por explante, além de maior qualidade das mesmas (explantes com coloração mais verde e com folhas maiores).

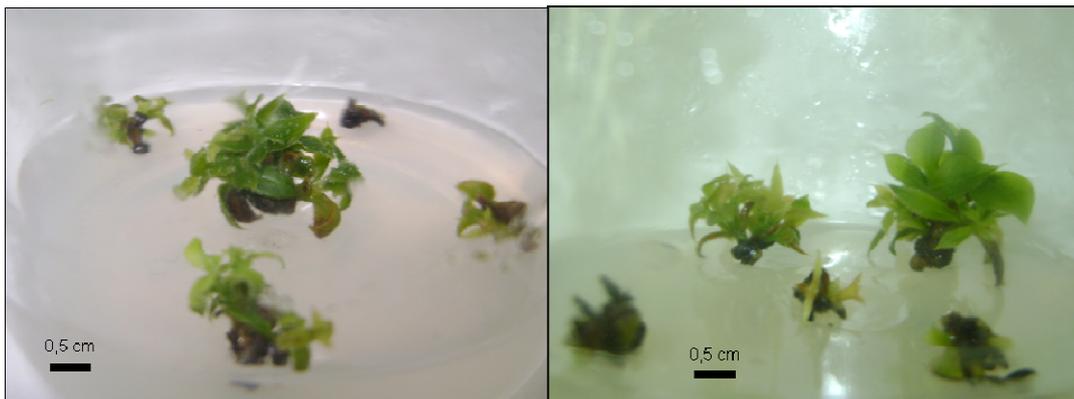


FIGURA 24. Brotações do 1º subcultivo de guabijuzeiro em meio WPM acrescentado de BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

O meio com BAP+ANA, apesar de ter sido inferior ao meio com BAP, apresentou porcentagem de sobrevivência acima de 50%, contudo provocou maior porcentagem de oxidação (37%) e o número de folhas por explante foi bem inferior ficando em torno de 6,8.

O número de brotações por explante e a altura apresentaram diferenças estatísticas em relação ao meio de cultivo e ao tipo de explante utilizado no cultivo inicial (apical ou nodal), como pode se observar nas Figuras 25 e 26.

O número de brotações por explante foi maior no meio com BAP, não havendo diferença entre os tipos de segmento utilizado. No meio com BAP+ANA os segmentos nodais apresentaram maior número de brotações por explantes.

Wagner Júnior *et al.* (2003), também observaram que o BAP teve influência positiva na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira 'Julior' (*Prunus spp*), nos quais as concentrações de $0,45$ e $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ proporcionaram as melhores respostas na altura e número de brotações, respectivamente.

Em relação à altura das brotações o tratamento com explantes provenientes de brotações de segmentos nodais no cultivo inicial, cultivados no meio com BAP, foram superiores aos demais tratamentos. Os explantes provenientes de brotações de segmentos apicais no cultivo inicial cultivados no meio com BAP foram superiores aos explantes provenientes de brotações de segmentos apicais e nodais cultivados no meio com BAP+ANA (Figura 26).

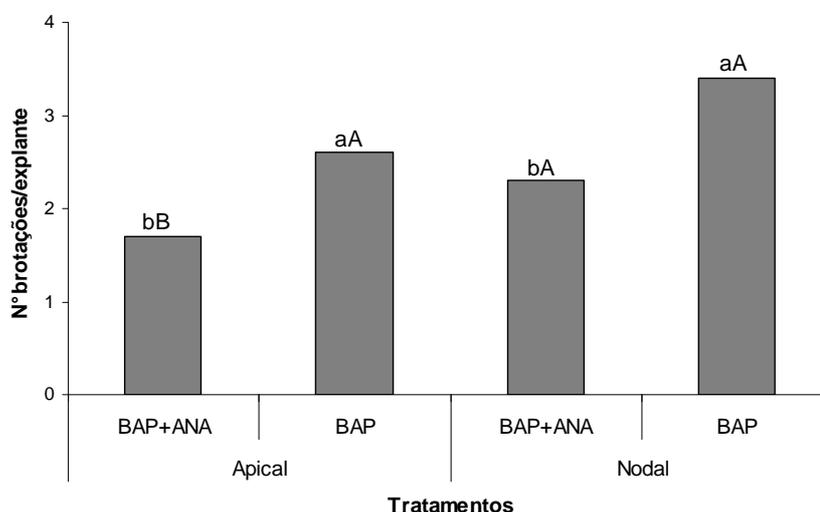


FIGURA 25. Média do número de brotações de guabijuzeiro no 1º subcultivo, mantendo-se a identificação do tipo de explante utilizado no cultivo inicial (apical e nodal) na fase de multiplicação, após 30 dias em meio de cultura WPM acrescidos de BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$) ou de BAP+ANA ($0,4+0,04 \text{ mg.L}^{-1}$). (Mesma letra maiúscula para explantes e minúscula para meio de cultivo, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

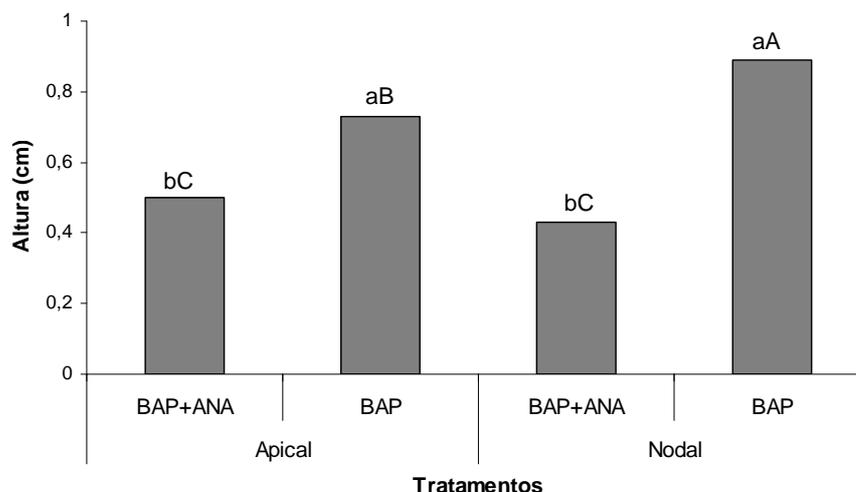


FIGURA 26. Altura das brotações de guabijuzeiro no 1º subcultivo, mantendo-se a identificação do tipo de explante utilizado no cultivo inicial (apical e nodal) na fase de multiplicação, após 30 dias em meio de cultura WPM acrescidos de BAP($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$) ou de BAP+ANA ($0,4+0,04 \text{ mg.L}^{-1}$). (Mesma letra maiúscula para explantes e minúscula para meio de cultivo, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009

c) Experimento 5: 2º subcultivo

Trinta dias após a inoculação do experimento anterior (Experimento 4), as brotações foram seccionadas junto a base e transferidas para novos meios cultura, realizando um segundo subcultivo. Manteve-se a identificação do explante utilizado no cultivo inicial (apical e nodal).

Nesta etapa foi mantido o meio com BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$), já que o mesmo mostrou-se eficiente no cultivo anterior e foi realizado um novo tratamento onde foi testado um meio de cultivo com três fitorreguladores associados 3 FIT- ($0,03 \text{ BAP} + 0,2 \text{ ANA} + 0,3 \text{ GA}_3 \text{ mg.L}^{-1}$), com o objetivo de alongar os explantes para a próxima etapa. Pois segundo Montovani *et al.* (2001), o GA_3 tem sido mais

frequentemente utilizado na micropropagação, para promover o alongamento caulinar.

Como resultados, os tratamentos utilizados nesta etapa foram eficientes obtendo-se alta sobrevivência. No tratamento com BAP os explantes provenientes de brotações de segmentos apicais (no cultivo inicial) apresentaram sobrevivência de 94,3%, e os provenientes de brotações de segmentos nodais (no cultivo inicial) foram de 100%, já o tratamento com três fitorreguladores (3FIT) associados foram de 95,7% e 98,6% respectivamente (Figura 27).

Em todos os tratamentos houve presença de calos (Figura 28), segundo Flores *et al.* (1998), os calos correspondem a uma massa de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, tamanho, conteúdo celular e espessura da parede.

A presença de calo na base das microestacas pode afetar negativamente a rizogênese (George *et al.*, 2008). No entanto, quando se objetiva a micropropagação por embriogênese somática (Almeida *et al.*, 2001), ou organogênese indireta, esse incremento pode ser interessante, por esses processos estarem relacionados diretamente com a produção de calo.

Nas duas variáveis avaliadas (porcentagem de sobrevivência e calos) tanto para meio de cultivo quanto a origem do explante utilizado não houve diferenças.

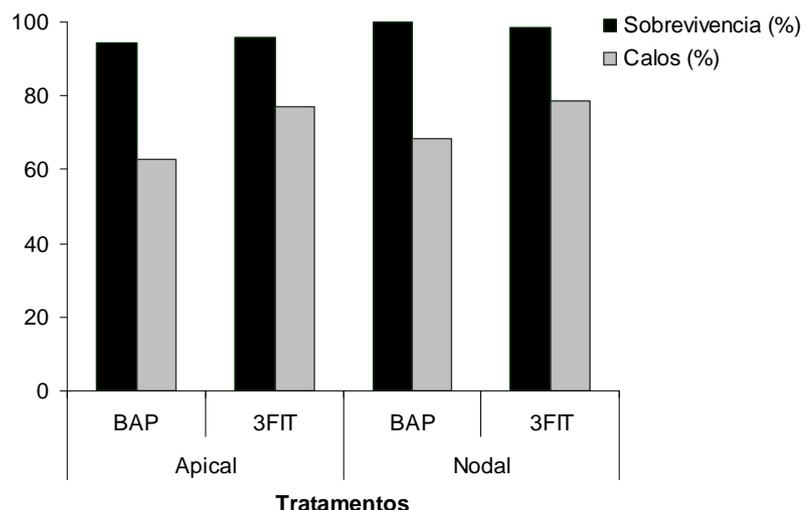


FIGURA 27. Porcentagem de sobrevivência e calos de segmentos de guabijuzeiro no 2º subcultivo, onde foi mantida a identificação do tipo de explante utilizado no cultivo inicial (apical e nodal), cultivados em meio de cultura WPM acrescentado de BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$), 3 FIT ($0,03 \text{ BAP} + 0,2 \text{ ANA} + 0,3 \text{ GA}_3 \text{ mg.L}^{-1}$). Para a % sobrevivência foi utilizado o teste Kruskal-Wallis (fitoregulador $P = 0,730$, explante $p = 0,121$). Para a % calos o teste utilizado foi o Duncan (fitoregulador $P = 0,196$ e explante $p = 0,904$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

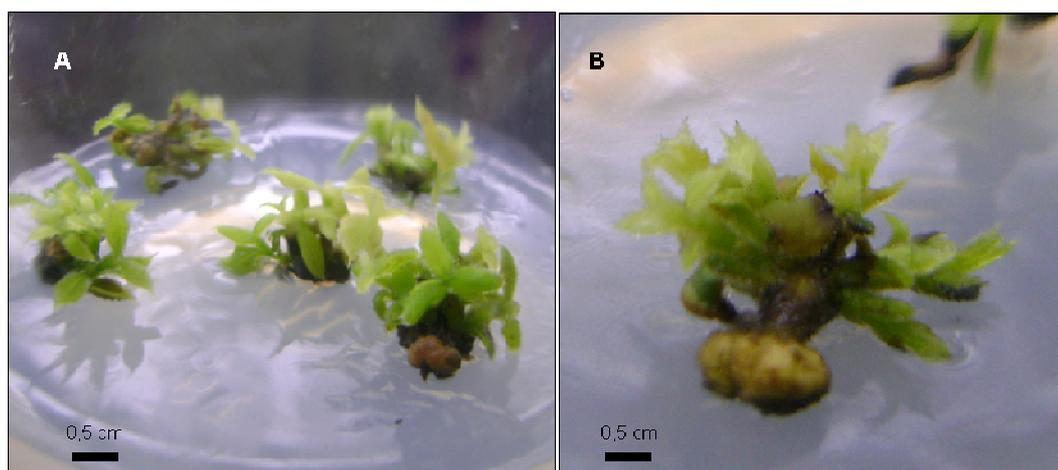


FIGURA 28. Guabijuzeiro: (A) Brotações com calos na base cultivados em meio com BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$); (B) Detalhe do calo na base das brotações. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Nesta etapa, na variável número de brotações e número de folhas, o meio com BAP continuou sendo superior, sendo que o número de brotações por explante ficou entre 3 e 3,6 e de folhas entre 19,7 a 23,9 (Figura 29), não havendo diferença entre a origem do explante utilizado (Tabela 8).

Resultados semelhantes foram relatados por Mello-Farias *et al.* (1996), estudando a multiplicação de porta-enxertos de pereira, observaram que a adição de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 não aumentou a taxa de multiplicação, o que foi obtido com a adição de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

Em relação à altura das brotações os explantes cultivados no meio com BAP não diferiram dos explantes cultivados no meio com três fitorreguladores, mas foi significativamente diferente em relação a origem do explante utilizado, sendo os explantes provenientes de brotações de segmentos nodais (no cultivo inicial) superiores aos de segmentos apicais (Tabela 8).

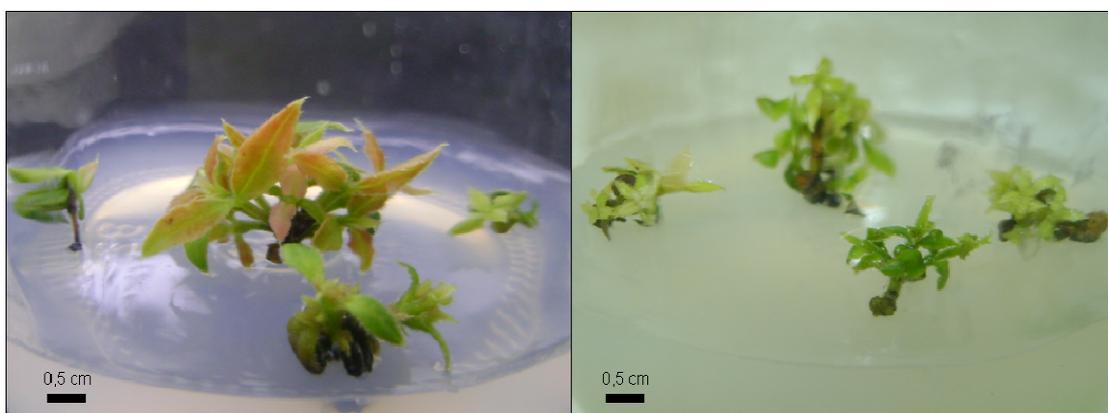


FIGURA 29. Brotações de guabijuzeiro do 2º subcultivo em meio WPM acrescentado de BAP ($0,6 \text{ mg.L}^{-1}$). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

As brotações alongaram no meio contendo BAP não havendo necessidade de transferência para outro meio de cultura, e também não sendo necessário acrescentar outros fitorreguladores ao meio de cultivo, o que

elimina uma etapa do cultivo *in vitro*, e conseqüentemente a diminuição dos custos.

TABELA 8. Número de brotações por explante, número de folhas e altura das brotações (cm) de guabijuzeiro do 2º subcultivo, onde foi mantida a identificação do tipo de explante utilizado no cultivo inicial (apical e nodal), em meio WPM acrescidos com BAP (0,6 mg.L⁻¹), 3 FIT (0,03 BAP + 0,2 ANA + 0,3 GA3 mg.L⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Tratamentos		Nºbrot/explante	Nºfolhas	Altura
Apical	BAP	3 a	23,9 a	0,75 Ba
	3FIT	1,65 b	10,4 b	0,56 Ba
Nodal	BAP	3,6 a	19,7 a	1 Aa
	3FIT	1,9 b	13,3 b	0,94 Aa
PrP>F	Meio de cultura	<0,001	<0,001	0,429
	Explante	0,509	0,727	<0,016
	Explante x Meio de cultura	0,621	<0,042	0,529
CV(%)		27,9	26,2	20,4
Transformação		-	-	√x

Médias seguidas pela mesma letra minúscula para meios de cultura e maiúscula para explante, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4.2.3.4 Experimento 6: Efeito do ANA e AIB no enraizamento *in vitro* de guabijuzeiro

Neste ensaio de enraizamento obteve-se alta sobrevivência das brotações nos dois tratamentos utilizados ao meio de cultivo (Tabela 9).

O tratamento com ANA suplementado ao meio de cultivo foi superior ao meio com AIB em relação à porcentagem de calos e raízes (Figura 30), estes resultados estão de acordo com o trabalho de Melo *et al.* (2001), onde observaram que o ANA foi eficiente na formação de raízes fasciculadas *in vitro* de guarirrobeira (*Syagrus oleracea*), enquanto o AIB foi ineficiente.

Mas apesar da superioridade, neste trabalho, no tratamento com ANA o enraizamento foi muito baixo (7%), já a porcentagem de calos foi alta (73%) bem superior ao tratamento com AIB que foi de apenas 15% (Tabela 9).

TABELA 9. Porcentagem de explantes de guabijuzeiro vivos, com calos e com raízes após 45 dias de inoculação em meios com ANA (0,2; 0,4 e 0,6 mg. L⁻¹) e AIB (0,2; 0,4 e 0,6 mg. L⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Tratamentos	Vivos (%)	Calos (%)	Raiz (%)
AIB	90	15	0
ANA	97	73	7
Valor P (ANOVA Kruskal-Wallis)	0,005	<0,001	<0,021

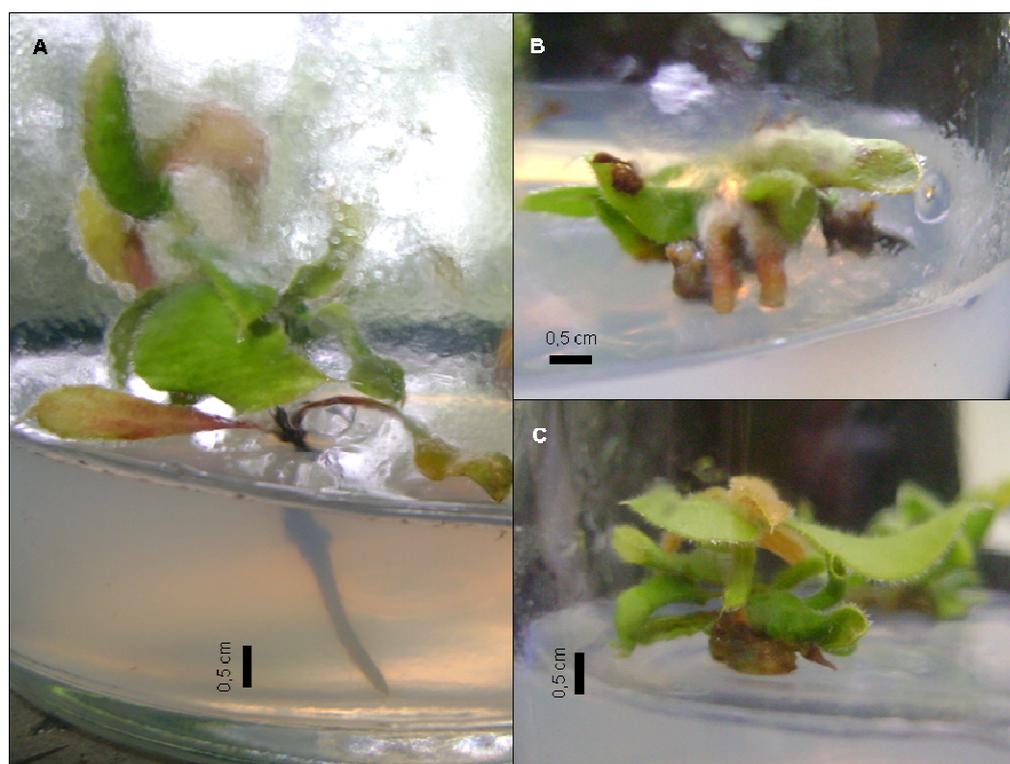


FIGURA 30. Guabijuzeiro: (A) Brotação com raiz cultivada em meio WPM suplementado com ANA (0,6 mg.L⁻¹); (B) Brotação com raiz e calo cultivada em meio WPM suplementado com ANA (0,6 mg.L⁻¹); (C) Brotação com calo na base cultivada em meio WPM suplementado com ANA (0,6 mg.L⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Em relação às concentrações de ANA utilizadas, foram observadas diferenças na porcentagem de calos, sendo as concentrações mais altas de ANA (0,4 e 0,6 mg.L⁻¹) com maior produção de calos. Na Figura 31 pode se observar uma tendência linear da porcentagem de calos conforme o aumento da concentração de ANA.

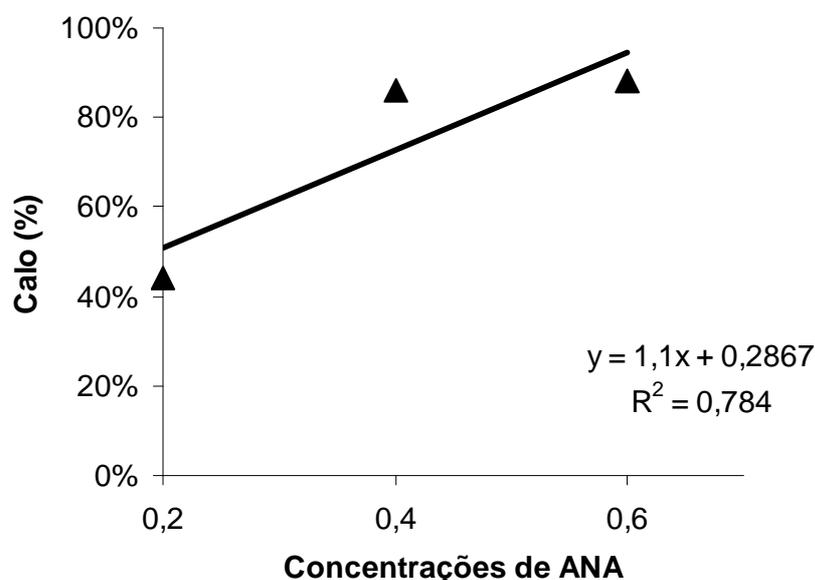


FIGURA 31. Porcentagem de calos em explantes de guabijuzeiro nos meios adicionados com ANA nas concentrações 0,2; 0,4 e 0,6mg.L⁻¹. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Segundo Grattapaglia & Machado (1990) quantidades excessivas de auxina estimulam a produção de calo. Embora o ANA possa induzir a formação de raízes, em algumas espécies por vezes até melhor que o AIB, pode também provocar efeitos indesejáveis por ser mais tóxico aos tecidos vegetais (Weaver, 1976).

Em trabalho com louro-pardo (*Cordia trichotoma*) o ANA provocou excesso de calosidade inibindo a multiplicação e o desenvolvimento das brotações (Mantovani *et al.*, 2001). Resultados similares à ação calogênica do

ANA também foram observados em goiabeira-serrana por Dal Vesco & Guerra (1999).

Na variável porcentagem de enraizamento o tratamento com 0,2 mg.L⁻¹ de ANA não foi eficiente, contudo nos demais tratamentos foram observados baixos percentuais de enraizamento (Tabela 10).

Farias *et al.* (1995) trabalhando com pereira (*Pyrus calleryana*) variedade D-6, obtiveram até 50% de enraizamento utilizando 1,4 mg.L⁻¹ (6,4 µM) de ANA. Quando não utilizaram ANA no meio de cultura, o enraizamento foi nulo.

TABELA 10. Porcentagem explantes de guabijuzeiro vivos, com calos e com raízes após 45 dias de inoculação em meios com diferentes concentrações de ANA (0,2; 0,4 e 0,6 mg.L⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Tratamentos	Vivos (%)	Calos (%)	Raiz (%)	
ANA	0,2	44 b	0	
	0,4	86 a	5	
	0,6	88 a	16	
Valor P (ANOVA Kruskal-Wallis)		0,368	<0,001	0,060

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Dunn's ao nível de 5% de probabilidade de erro

Nos tratamentos com AIB não houve diferença para a porcentagem de brotações vivas que variou de 78% a 100% (Tabela 11), apesar de não haver diferença entre as concentrações de AIB, pode se observar que a concentração de 0,6 mg.L⁻¹ apresentou a menor taxa de brotações vivas, talvez concentrações mais altas possam ser tóxicas para esta espécie.

Segundo More & Khalatkar (1988), concentrações sub-ótimas de AIB podem não alcançar o nível requerido de auxina para a iniciação radicular e

quando supra-ótimas inibem o enraizamento, restringindo a divisão e alongamento celular.

A porcentagem de calos foi baixa (17%), não havendo diferença entre as concentrações de AIB testadas. Em meio de cultivo com diferentes concentrações de AIB não ocorreu enraizamento.

Resultados diferentes foram encontrados por Nascimento *et al.* (2008), estudando uvaieira, onde avaliaram o enraizamento em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de AIB (variando de 0,0 a 4,0 mg.L⁻¹), os melhores resultados foram obtidos em 1,0 mg.L⁻¹ de AIB.

TABELA 11. Porcentagem de explantes de guabijuzeiro vivos, com calos e com raízes após 45 dias de inoculação em meios com diferentes concentrações de AIB (0,2; 0,4 e 0,6 mg. L⁻¹). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Tratamentos		Vivas (%)	Calos (%)	Raiz (%)
AIB	0,2	100	17	0
	0,4	96	17	0
	0,6	78	11	0
Valor PrP>F (ANOVA Kruskal-Wallis)		0,09	0,09	1,00

Esta ausência ou baixo percentual de enraizamento nos tratamentos podem ter ocorrido devido à baixa concentração de auxina utilizada no meio de cultivo ou devido à influência do BAP utilizado na fase de multiplicação, já que o BAP pode ter estimulado a produção de citocininas endógenas (Vankova *et al.*, 1991) e isso, por sua vez, pode inibir a iniciação da raiz.

Neste caso a citocinina usada na fase de multiplicação pode ter influenciado negativamente o enraizamento de guabijuzeiro, fato já observado em outras mirtáceas por Grattapaglia *et al.* (1987) que identificaram efeito

residual de BAP na inibição do enraizamento de *Eucalyptus urophylla*, *E. cloeziana*, *E. citriodora* em explantes provenientes de um teste fatorial combinando BAP e ANA.

5 CONCLUSÕES

- O SST da polpa variou entre as procedências de 8,9 a 23,6, o pH ficou em torno de 4,7, todas apresentaram baixa acidez da polpa (0,07 a 0,19) e casca (0,14 a 0,27), apenas uma procedência apresentou vitamina C, o diâmetro dos frutos é bastante irregular dentro e entre os lotes de guabijuzeiro.

- É possível obter mudas de guabijuzeiro por estacas apicais com quatro folhas cultivadas no mês de fevereiro, sem a utilização de AIB.

- É possível obter mudas de guabijuzeiro por enxertia de garfagem tipo fenda cheia, sendo enxerto e porta-enxerto da mesma espécie, sendo os porta-enxertos com caule lenhoso os mais indicados para uso.

- Para a desinfestação das sementes de guabijuzeiro o hipoclorito de sódio na concentração de 4% por vinte minutos é eficiente, sendo possível obter material livre de microrganismos para propagação *in vitro* da espécie.

- Na fase de multiplicação os segmentos apicais ou nodais cultivados em meios com BAP em concentrações baixas até 1mg.L^{-1} , é eficiente influenciando positivamente no estabelecimento e multiplicação *in vitro* da espécie.

- É possível o enraizamento de guabijuzeiro *in vitro* com a utilização da auxina ANA no meio de cultivo na concentração de $0,6\text{ mg.L}^{-1}$.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O guabijuzeiro tem um grande potencial para a exploração econômica, não somente pelo consumo de seus frutos, o qual pode ser *in natura* ou processado, mas também pelo seu valor ornamental.

No entanto, são escassas as informações sobre a qualidade dos frutos e a propagação vegetativa desta espécie, o que dificulta sua comercialização.

Os resultados aqui apresentados mostram aspectos que podem ser relevantes para a continuidade de estudos posteriores. Portanto ficam algumas observações a seguir:

A análise dos frutos desta espécie deve ser ampliada realizando novas análises com novos parâmetros avaliados, sugere-se realizar avaliações em épocas diferentes e com frutos em estágio de maturação diferente, além de ampliar o número de matrizes avaliadas.

Dentro dos métodos de propagação vegetativa testados, o método por estaquia deve ser realizado em outros meses do ano. Sugere-se testar novas concentrações de AIB na base da estaca, modificar o regime de irrigação da nebulização.

Na propagação vegetativa por enxertia fica a sugestão de realizar os experimentos em outras épocas do ano e que sejam testados outros métodos de enxertia. Sugere-se que os experimentos sejam conduzidos em condições

de casa de vegetação e telado na mesma época do ano, a fim de se estabelecer as melhores condições ambientais.

Nos estudos de propagação *in vitro* de guabijuzeiro devem ser testadas outras concentrações de auxinas, que venham a favorecer o enraizamento das brotações. Sugere-se, após a fase de multiplicação com citocininas, transferir os explantes para um meio de cultura sem fitorregulador. Após colocar em meio de cultura com auxinas, este processo poderia diminuir o efeito residual das citocininas. Finalmente, sugere-se iniciar estudos de desinfestação de explantes provenientes de plantas adultas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIGUE, M. L.; MADRUGA, M. S.; FIOREZE, R.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. **Aspecto da ciência e tecnologia de alimentos**. João Pessoa: UFPB, 2002. v.1, 198p.

ALI, M. A.; LÜDDERS, P. *In vitro* culture and its application on the cloning of guava (*Psidium guajava* L.). **Journal of Applied Botany**, Göttingen, v.75, p.164-167, 2001.

ALMEIDA, E. P.; OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 51-54, 2001.

ALVES, R. E. Características das frutas para exportação. In: NETTO, A. G.; ARDITO, E. F. G.; GARCIA, E. E. C. G.; BLEINROTH, E. W.; FREIRE, F. C. O.; MENEZES, J. B.; BORDINI, M. R.; SOBRINHO, R. B.; ALVES, R. E. **Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996, 30p. (EMBRAPA- SP, Publicações Técnicas Frupep, 21).

ANDRADE, M.W.; LUIZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Alli.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

ANDRADE, R. N. B. **Germinação de sementes de plantas ornamentais ocorrentes no Rio Grande do Sul**. 2002. 110f. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2002.

ARGENTA, L. C.; BENDER, R. J.; KREUS, C. L.; MONDARDO, M. Padrões de maturação índices de colheita de maçãs CVS. Gala Golden Delicious e Fuji. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 10, p. 1259-1166, 1995.

APEL, M. A; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X200600030001&lng=es&nrm=iso Acesso em: 18 set. 2008.

ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : Embrapa-SPI, 1998. v.1, p.261-296.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Washington: 15th ed. Arlington: AOAC, 1990. 1298 p.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação e interesse ecológico. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz, p. 325p, 2002.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiosperma do Brasil**. Viçosa: UFV, v3, 326p, 1991.

BEZERRA, J.E.F; LEDERMAN, I.E.; FREITAS, E.V. da; SANTOS, V.F. dos. Método de enxertia e idade de porta-enxerto na propagação da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.3, p. 262-265, 1999.

BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; FREITAS, E. V. da; SILVA JUNIOR, J. F. da. Propagação de genótipos de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pelo método de enxertia de garfagem no topo em fenda cheia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.160-162, 2002.

BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; PEDROSA, A. C.; DANTAS, A. P.; FREITAS, E. V. de. Performance of surinam cherry, (*Eugenia uniflora* L), in Pernambuco, Brasil. **Acta Horticulturae**, Vitória/ES, v.370, 1995.

BOLLMARCK, M.; KUBAT, B.; ELIASSON, L. Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 132, p. 262- 265, 1988.

BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**: Dordrecht: 2ed. Martinus Nijhoff, 1982, p. 4-35.

BRACK, P.; KINUPP, V. F.; SOBRAL, M. E.G. Levantamento preliminar de espécies frutíferas de árvores e arbustos nativos com uso atual ou potencial do Rio Grande do Sul. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2004, Porto Alegre/RS. **Anais...** Porto Alegre, 2004. CDROM.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 136, de 31 de março de 1999. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, p.25, 1º de abril 1999.

BRUM, G. R. **Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) Roxo de Valinhos**. 2001. 41f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. 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. 87-132.

CANTAGALLO, F. S.; AZEVEDO, F. A.; SCHINOR, E. H.; FILHO, F. A. A. M.; MENDES, B. M. J. Micropropagação de citrumelo 'swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.136-138, 2005.

CARVALHO, J. T. de; GUERRA, N. B. Efeitos de diferentes tratamentos técnicos sobre as características do suco de acerola. In: SÃO JOSÉ, A. R.; ALVES, R. E. Vitória da Conquista – BA, 1995, p.96-101.

CHAVES, J. B. P. **Noções de microbiologia e conservação de alimentos.** Viçosa: UFV, 113p, 1993.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Lavras: ESAL/FAEP, 1990. 320p.

CID, L. P. B.; GOMES, A. C. M.; COSTA, S. B. R.; TEIXEIRA, J. B. Micropropagation of *Miconia* sp. a woody melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 9, n. 1, p. 21-25, 1997.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de bap sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* huber ex ducke (paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p.118-124, 2004.

COSTA, A. S. **Sustentabilidade da Produção de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): Micropropagação visando à conservação *in vitro*.** 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2006.

COSTA JÚNIOR, W. H. da. **Enraizamento de estacas de goiabeira: influência de fatores fisiológicos e mesológicos.** 2000. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

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.

CRONQUIST, 1981. **An integradet system of classification of flowering plants.** New York: Columbia University Press , vol 31, 600p.

CZYHRINCIW, N. Tropical fruit technology. **Advances in Food Research**, New York, v. 17, p. 153 -214, 1969.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p.60-64, 1999.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Editora da UNESP, 2002. 288p.

DUARTE, O.; HUETE, M.; LUDDER, S. P. Propagation of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) Berg.) by terminal leafy cuttings. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.452, p.123-128, 1997.

ESPÍNDOLA, A. C. M.; ALMEIDA, C. C. S.; CARVALHO, N. S. G.; ROZA, M. L. A. Diâmetro do caule e método de enxertia na formação de mudas de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.). **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas-RS, v.10, n. 3, p. 371-372, 2004.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: Ed. E Gráfica Universitária, 1994.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FONTES, G. de R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178p.

FARIAS, P. C. M.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de pereira *Pyrus calleryana* D-6. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.17, n.1, p.109-120, 1995.

FERNANDEZ, R. M.; *et al.* Osmotic dehydration of muskmelon (*Cucumis melo*): influence of blanching and syrup concentration. **Journal of Food Processing and Preservation**. Westport, v.31, n.4, p. 392–405, 2007.

FONSECA, A. A. A.; HANSEN, D. S.; SILVA, S. A.; COSTA, J. A.; CARVALHO, C. A. L.; RIBEIRO, L. S. **Caracterização e qualidade de frutos de carambolas produzidos em Cruz das Almas-BA**. Disponível em: http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=11974. Acesso em: 27/08/2009.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E. T. H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.3, p. 201-205, 1998.

FRANZON, R. Frutíferas nativas do Sul do Brasil. In: **Simpósio Nacional do Morango**: Palestras do II Simpósio Nacional do Morango; I encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 296p.

FRANZON, R.C. **Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. 2008. 100f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

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

FRANZON, R. C.; GONÇALVES, R. S.; ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B.; TREVISAN, R. Propagação da pitangueira através da enxertia de garfagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.2, p.488-491, 2008.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd Edition, England: Exegetics Limited, v.1, 1993.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd Edition, Dordrecht: Springer, v 1, 2008.

GOMES, R. P. **Fruticultura Brasileira**. São Paulo: Nobel, 2007.

GOMES, W. A; MENDONÇA, R. M. N; SOUZA, E. P; ESTRELA, M. A; SILVA, S. M; SOUZA, A. P. Garfagem e diâmetro de enxertia na obtenção de mudas de umbuzeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: DCM/Incaper, 2008.

GONZAGA NETO, L.; AMARAL, M. G.; SURESSIG, M. Enxertia por garfagem e borbulha em acerola sob telado. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.9, p. 635-638, 1996.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de biotecnologia - CCA/UFSC**. Edição da Steinmacher, 2006. p 1-48.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI: CNPH, 1990, p.99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T. F.; CALDAS, L. S. Efeito residual de BAP e ANA na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2, 1987, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: Embrapa/SPI: CNPH, 1987.

HANRY, I. S.; THORPE, T. A.; Regeneration os plantlets through organogenesis from matures embryos of jack pine. **Plant cell, tissue and org culture**, Calgary, v.37, p. 150-164, 1994.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Plant Propagation**. 4 ed. New Jersey: Pretince-Hall, 1983.p. 727.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D. E.; DAVIES, JR, F.T. **Plant propagation: principles and practices**. 5. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1990. 647p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIS JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7 ed. New York: Englewood Clippis, 2002.

HARTNEY, V. J. Tissue culture of Eucalyptus. In: International Plant Propagators Society. **Combined Proceedings**. Seattle, v. 32, p.98-109, 1982.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. London: Batsford, 1993, p.119.

HERNANDEZ, Y. *et al.* Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v.96, n.4, p. 654–664, 2006.

HISIÃO, A. I.; WORSHAM, A. D.; MORELAND, D. E. Effects of sodium hypochlorite and certain plant growth regulators on germination of witchweed (*Striga asiatica*) seeds. **Weed Science**, Champaign, v.29, n.1, p. 98-100, 1981.

HOPPE, J. M.; SCHUMACHER, M. V.; MIOLA, A. C.; OLIVEIRA, L. S. Influência do diâmetro de estacas no desenvolvimento dos brotos de *Platanus x acerifolia*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 25-28, 1999.

HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. 2008. 52p. Dissertação (mestrado em engenharia florestal) - Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências Rurais. Santa Maria.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.

KECHINSKI, C. P. **Avaliação do uso de ozônio sobre a conservação do mamão papaia (*Carica papaya* L.)** Porto Alegre, 2007, 125f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

KALIL FILHO, A. N. A Micropropagação mogno (*Swietenia macrophylla*): desinfestação e germinação. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMAS FLORESTAIS – FOREST 2000, 6., 2000. Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: [s.n.], 2000. p. 1013.

LATTUADA, D. S.; SOUZA, P. V. D. de; GONZATTO, M. P.; SCHWARZ, S. F. Enxertia Herbácea em Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: DCM/Incaper, 2008.

LEGRAND, C. D. **Las Mirtáceas del Uruguay**, Anales del Museo de Montevideo: Universidad de La Republica, Facultad de Agronomia, III. Bol. n° 101, 1968. 80p.

LIEW, T. K.; TEO, C. K. H. Multiple shoot production in vitro of the tropical timber tree, sentang (*Azadirachta excelsa* Linn.). **HortScience**, Alexandria, v. 33, n. 6, p. 1073-1075, 1998.

LIMA, A. C. S., ALMEIDA, F. A. C., ALMEIDA, F. C. G. Estudos sobre o enraizamento de estacas de acerola (*Malpighia glabra* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p. 7-13, 1992.

LIMA, V. L. A. G. de; MÉLO, E. de A.; LIMA, L. dos S.; NASCIMENTO, P. P. do. Caracterização física-química e sensorial de pitanga roxa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.22, n.3, p.382-385, 2000.

LIRA JUNIOR, J. S.; BESERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F. **Pitangueira**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, 2007. 87p.

LLOYD, G. McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.

LONGHI, R. A. **Livro das árvores e arvoretas do Sul**. Porto Alegre: L&PM, Ed. 2°, 1995, p. 176.

LOPES, P. Z. **Propagação vegetativa e interação com endomicorrizas arbusculares em mirtáceas nativas do sul do Brasil**. 2009. 120f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa : Plantarum, 2002. v.1, 265p.

MANTOVANI, N. C; FRANCO, E. T. H; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudeu). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: Myrtales**. Santa Maria: UFSM, 1997. 304p.

MARTINOTTO, C. **Cultivo *in vitro* e aspectos morfofisiológicos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.)**. 2004. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MATTOS, J. R. de. Fruteiras nativas do Sul do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas, BA. **Anais...** Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMPF, 1993. p. 35-50.

- MATTOS, J. R. **Myrtaceae do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 1989. 721p.
- MELO, B; PINTO.; J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Efeito de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirubeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.). **Biociências J**, Uberlândia, v. 17, n.1, p. 49-59, 2001.
- MELLO-FARIAS, P. C; PETERS, J. A; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de pereira, “old home” x “Farmingdale” 9. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, V. 2, n. 2, p. 71-72, 1996.
- MIELKE, M. S. **Multiplicação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.) através de enxertia**. Pelotas, 1992. 46p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1992.
- MORE, V. N.; KHALATKAR, A. S. Effect of gibberellic acid, kinetin and indolbutyric acid on propagation in *Diffenbachia pict.* **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 226, p. 473-478, 1988.
- NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179p
- NACHTIGAL, C. M; HOFFMANN, A.; KLUGE, R. A.; FACHINELLO, J. C.; MAZZINI, A. R. A. Enraizamento de estacas semi-lenhosas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.1, p.229-235, 1994.
- NASCIMENTO, A.C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M.; NOGUEIRA, G.; SOARES, F. P. AIB e BAP no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica. Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v.6, n.2, p.223-228, 2008.
- NETO, L. G; AMARAL, M. G; SAUERESSING, M. Enxertia por garfagem e borbulhia em acerola sob telado. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 31, nº9, p. 635-638, 1996.
- NORBERTO, P. M. CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M.; VEIGA, R. D.; PEREIRA, G. E.; MOTA, J. H.; Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). **Ciências agrotécnica**, Lavras, v.25, n.3, p.533-541, 2001.
- OLIVEIRA, A. A. **Propagação de abacateiros (*Persea* sp.) por mergulhia de cepa, com anelamento de caule e aplicação de AIB**. 1999. 106f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1999.
- OLIVEIRA, A. L. de; BRUNINI, M. A.; SALANDINI, C. A. R.; BAZZO, F. R. Caracterização tecnológica de jaboticabas ‘Sabará’ provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.397-400, 2003.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito dos substratos artificiais no enraizamento e no desenvolvimento de maracujazeiro-azedo e doce por estaquia**, 2000. 71f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

PÁDUA, T. Propagação das árvores frutíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.9, n.101, p.11-19, 1983.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D.; VALE, M.R. do; SILVA, C.R.de. R.e **Fruticultura Comercial**: Propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA.FAEPE, 2001. 137p.

PEREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.63, p.133-141, 2000.

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

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. 646p.

PINEDO, P. M.; LINARES, C.; MENDOZA, H.; ANGUIZ, R. **Plan de mejoramiento genético de camu camu**. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Iquitos, 2004. 52 p

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. **Sellowia**, Itajaí, vols. 34-35. 1983. p. 1-525.

RIBEIRO, M. V.. **Estabelecimento *in vitro* e análise da variabilidade genética de acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) coletados no estado do Rio Grande do Sul**. 2008. 42p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

ROCHA, S. C. **Micropropagação de canjerana (*Cabralea canjerana*)**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa':efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 365-367, 2003.

SANCHOTENE, M. do C. C. **Frutíferas nativas úteis a fauna na Arborização Urbana**. Porto Alegre: FEPLAN, 1989.311p.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. 2004. **Análise da germinação – um enfoque estatístico**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília. 248 p.

SANTAROSA, E.; ANZANELLO, R.; GONZATTO, M. P.; SCHWARZ, S. F.; SOUZA, P. V. D. Presença de folhas e aplicação de ácido indolbutírico em estacas de guabijuzeiro. Disponível em: http://200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/PropagacaoSementesMudas/20080723_143528.pdf acesso em: 16 jan. 2010.

SANTOS, A. F., SILVA, S. M., MENDONÇA, R. M. N., SILVA, M. S. Alterações Fisiológicas Durante a Maturação de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**. Miame, V.46. p.52-54, 2002.

SANTOS, C. M. R.; FERREIRA A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 2, p. 13-20.

SCARPARE F. V.; KLUGE, R. A.; SCARPARE FILHO, J. A.; BORBA, M. R. C. Propagação da jaboticabeira 'Sabará' (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg.) através de estacas caulinares. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. *In*: Propagação de plantas frutíferas. 1ª ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. p.155-173.

SCUTTI, M. B. Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) *in vitro* e por estaquia. 1999. *In*: Efeito do AIB e de diferentes tipos de estaca na propagação vegetativa da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg). **Revista brasileira Agrociência**, v.10, n. 4, p. 515-518, 2004.

SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. 1995. Estudos de fórmulas para cálculo de germinação. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 62-73.

SIMÃO, SALIM. **Tratado de Fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760p.

SIMARELLI, M. Afinal, o que é biodiversidade? **Revista Frutas e Derivados**. São Paulo, ed. 8, p.33-34, 2007.

SUGUINO, E.; GLÓRIA, B. A.; ARÁUJO, P. S. R.; SIMÃO, S. Propagação vegetativa de camu-camu por meio de enxertia intergenérica na família myrtaceae. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.12, p.1477-1482, 2003.

SOARES, R. S.; SILVA, L. C.; SOUZA, P. V. D.; MARODIN, B. G. A.; SCHWARZ, S. F.; LOPES, P. Z.; RUFATO, L. Enraizamento de estacas semi-lenhosas de cerejeira-do-Rio-Grande (*eugenia involucrata* dc.) tratadas com antioxidante, floroglucinol e AIB. Disponível em: http://200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/PropagacaoSementesMudas/20080725_123552.pdf Acesso em: 18 jan. 2010.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciências agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; DONINI, L. P.; RIBEIRO, M. F. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, 2008.

SOUZA, J. **Propagação *in vitro* de fruteiras nativas: araçá (*Psidium Cattleianum* Sabine), feijoa (*Acca selowiana* (Berg) Burret) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2007. 125f. Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

TERMINGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005. 182p.

TONIETTO, S. M.; Tonietto, A.; Schlindwein, G.; Duprat, A. C. D.; Costa, Á. A.; Bender, R. J. Caracterização química da polpa de butiá (*Butia capitata* Mart.) procedentes do litoral médio do Rio Grande do Sul. Disponível em: http://200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/ProcessAgro/20080730_175612.pdf Acesso em 21 out. 2008.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – Serviço de Produção de Informação/Embrapa – CNPH. 1998. v. 1, p. 183 – 260.

UEMATSU C.; TSUJIMOTO M.; SUGIMOTO M. In vitro Propagation of *Eugenia uniflora* L. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v.16, n.21, p.159-162, 1999.

VANKOVA, R.; HSIAO, K. C.; BORNMAN C. H.; GAUDINOVA, A. Effects of synthetic cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells in suspension. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 10, p. 197-199, 1991.

VALLILO, M. I.; GARBELOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L. C. A.; Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de fruticultura**, Jaboticabal -SP, v. 27, n. 2, 2006.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N. In vitro propagation of *Acacia* species - a review. **Plant Science (Limerich)**, Limerich, v. 163, p. 663-671, 2002.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T.obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, v.34, n.4, p.507 – 511, 2004.

VIEITEZ, A. M., VIEITEZ, E. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 50, n.2, p.127-130, 1980.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; WENDLING, I.; OLIVEIRA, M. L. D. Propagação de cedro-rosa por miniestaquia. *In*: Inoue, M. T.; Putton, V. Macropropagação de 12 espécies arbóreas da floresta ombrófila mista. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 37, n. 1, 2007.

YASSEN, M. J.; SHERYL, A. B.; SCHNELL, R. J.; SPLITTSTOESSER, W. E. *In vitro* shootproliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. **PlantCell Reports**, Berlin, v. 14, p. 525-528, 1995.

YASELGA T. M.; LARRENA L.; RIOS-CASTANHO D. Caracterización de 3 tipos de guayaba en 6 zonas producción del Ecuador con fines industriales. *In*: CONGRESS OF THE TROPICAL REGION, 21., 1977, Quito. **Anais...** Quito: [s.n.], 1977. p. 18 – 20.

WAGNER JÚNIOR, A.; COUTO, M.; QUEZADA, A. Multiplicação “*in vitro*” do porta-enxerto de ameixeira ‘Julior’. **Revista brasileira Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 121-124, 2003.

WIELEWICK, A. P.; LEONHARDT, C.; SCHLINDWEIN, G.; MEDEIROS, A, C, S. Proposta de padrões de germinação e teor de água para sementes de algumas espécies florestais presentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, vol. 28, nº 3, p.191-197, 2006.

WEAVER, R. J. **Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura**. Mexico, DF: Trillas, 1976. 622p

8 APÊNDICE

APÊNDICE 1. Composições do meio de cultivo WPM.

Compostos (mg.L⁻¹)	WPM
NH ₄ NO ₃	400
KNO ₃	-
K ₂ SO ₄	990
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	556
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3
H ₃ B ₀₃	6,2
KI	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ .EDTA	37,2
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,25
CaCl ₂ . 2H ₂ O	-
CoCl ₂ . 6H ₂ O	-
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,25
Vitaminas	
Tiamina	1,0
Piridoxina	0,5
Ácido Nicotínico	0,5
Glicina	-
Fonte de Carbono	
Sacarose	30 x103
Mio-Inositol	100
Agente Gelificante	
Ágar-Ágar	6x103