

MARCIA BRUNNER SCUTTI

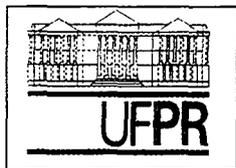
PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DA GUABIROBEIRA
(*Campomanesia xanthocarpa* Berg.)
***IN VITRO* E POR ESTAQUIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração - Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette.

CURITIBA

1999



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **MARCIA BRUNNER SCUTTI**, sob o título "**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DA GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* BERG.) IN VITRO E POR ESTAQUIA**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 16 de julho de 1999.

Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas
Primeiro Examinador

Professora Dra. Marguerite Quoirin
Segundo Examinador

Professor Dr. Amir Pissaia
Terceiro Examinador

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Quarto Examinador

Professor Dr. Flávio Zanette
Presidente da Banca e Orientador

Ao meu marido, MARCELO, pelo incentivo, apoio e críticas durante o período de realização deste curso. Pelo seu amor, dedicação e confiança em todos os momentos. Pela felicidade do nascimento da primeira filha, GIULIA.

AGRADECIMENTOS

A Érica C. Mielke, funcionária do Horto Municipal de Curitiba, pela ajuda na obtenção das plantas de guabirobeira junto ao Horto Florestal da capital.

Ao Sr. Otávio, proprietário do Sítio São Marcos, por permitir a coleta de material de campo em sua propriedade.

Ao professor Olavo Guimarães, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, pela identificação da espécie de guabirobeira.

Às professoras Marguerite Quoirin e Cecília Iritani, do Departamento de Botânica da UFPR, e ao professor Miguel P. Guerra, da Universidade Federal de Santa Catarina, por suas orientações na condução deste trabalho.

À professora Luciana L. F. Ribas, do Departamento de Botânica da UFPR, pela amizade, empréstimo de material, orientações e empenho na correção deste trabalho.

Em especial aos professores Luiz A. Biasi e Henrique S. Koehler, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do SCA, pelo inestimável auxílio na co-orientação deste trabalho.

Em especial ao Prof. Luiz Doni Filho, Coordenador do Curso de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal, pela inestimável amizade, incentivos e críticas essenciais para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao professor Amir Pissaia pelo empenho na correção deste trabalho e ao professor Edilberto Possamai, pelo auxílio na tradução do abstract.

Aos funcionários Gilson e Humberto, do laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do SCA da UFPR, pelo precioso auxílio na execução das tarefas de laboratório.

Às funcionárias da biblioteca do Setor de Ciências Agrárias da UFPR e da biblioteca central da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós da Universidade de São Paulo, no auxílio à busca de material bibliográfico.

À Maria Elizabete Doni, pelo valioso auxílio na organização deste trabalho.

A meus pais, Roberto e léte, pelo constante apoio e confiança.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DE <i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg..	04
2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ESTAQUIA	06
2.2.1 Estaquia semi-lenhosa.....	11
2.2.2 Estaquia herbácea	12
2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA <i>IN VITRO</i>	13
2.3.1 Meios de cultura.....	15
2.3.2 Contaminação <i>in vitro</i>	16
2.3.3 Micro-estaquia	19
2.3.4 Cultura de meristemas	21
2.3.5 Embriogênese somática	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO.....	28
3.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ESTAQUIA.....	28
3.2.1 Estaquia semi-lenhosa.....	29

3.2.2 Estaquia herbácea.....	30
3.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA <i>IN VITRO</i>	32
3.3.1 Micro-estaquia.....	33
3.3.1.1 Matrizes - plantas da casa de vegetação.....	33
3.3.1.2 Matrizes - árvores adultas a campo.....	35
3.3.1.3 Matrizes - plântulas assépticas.....	36
3.3.2 Cultura de meristemas.....	39
3.3.3 Embriogênese somática.....	41
3.3.3.1 Testes preliminares.....	42
3.3.3.2 Fases da embriogênese somática	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ESTAQUIA.....	46
4.1.1 Estaquia semi-lenhosa	46
4.1.2 Estaquia herbácea.....	49
4.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA <i>IN VITRO</i>	51
4.2.1 Micro-estaquia.....	51
4.2.1.1 Matrizes – plantas da casa de vegetação.....	51
4.2.1.2 Matrizes - árvores adultas a campo.....	54
4.2.1.3 Matrizes - plântulas assépticas.....	56
4.2.2 Cultura de meristemas.....	61
4.2.3 Embriogênese somática.....	66
4.2.3.1 Testes preliminares.....	66
4.2.3.2 Fases da embriogênese	67
5 CONCLUSÕES	78

ANEXOS.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

s = segundos

min = minutos

h = horas

cm = centímetros

mm = milímetros

BAP = 6-benzilaminopurina

AIB = ácido indolbutírico

AIA = ácido indolacético

ANA = ácido naftalenoacético

2-iP = 2-isopenteniladenina

2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético

GA₃ = ácido giberélico

Cin = cinetina

NaOCl = hipoclorito de sódio

v/v = volume / volume

MS = MURASHIGE e SKOOG (1962)

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. ASPECTOS DA ESTAQUIA SEMI-LENHOSA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.): A- EXPERIMENTO INSTALADO NA CASA DE VEGETAÇÃO; B- CARACTERÍSTICAS DAS ESTACAS AO FINAL DO EXPERIMENTO: COM BROTAÇÕES, COM GEMAS INCHADAS, COM FOLHAS VELHAS, BROTAÇÕES MORRENDO, E ESTACAS MORTAS; C- DETALHE DOS CALOS FORMADOS NA BASE DE ALGUMAS ESTACAS; D- ASPECTO DAS BROTAÇÕES AO FINAL DO EXPERIMENTO 48
- FIGURA 2. ASPECTOS DA MICRO-ESTAQUIA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) A PARTIR DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS: A- GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO* APÓS 28 DIAS EM MEIO DE CULTURA MS ACRESCIDO DE 6 g.L⁻¹ DE ÁGAR; B- DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS GERMINADAS *IN VITRO* EM MEIO MS LÍQUIDO EM BASE DE ALGODÃO, 45 DIAS APÓS A GERMINAÇÃO; C- DETALHE DE MICRO-ESTACA COM RAIZ EM MEIO MS/2 SEM REGULADOR; D- DETALHE DE MICRO-ESTACA COM CALO NA BASE EM MEIO MS/2 COM 2 mg.L⁻¹ AIB; E- ASPECTOS DA MULTIPLICAÇÃO EM MEIO MS COM 7 g.L⁻¹ DE ÁGAR: 1- COM 2 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ AIB ; 2- SEM REGULADORES..... 60
- FIGURA 3. ASPECTOS DA CULTURA DE MERISTEMAS E MICRO-ESTAQUIA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) A PARTIR DE PLANTAS EM CASA DE VEGETAÇÃO: A- MUDA EM CASA DE VEGETAÇÃO, COM BROTAÇÕES NOVAS APÓS A PRIMEIRA PODA; B- FRASCO COM MICRO-ESTACA APÓS O ISOLAMENTO; C- EXPERIMENTO DE MICRO-ESTAQUIA INSTALADO NA SALA DE CRESCIMENTO; D- TUBO DE ENSAIO COM MERISTEMA EM DESENVOLVIMENTO EM MEIO DE CULTURA SEM REGULADORES DE CRESCIMENTO..... 65

FIGURA 4. ASPECTOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS: A- EMBRIÃO ZIGÓTICO ISOLADO COM INÍCIO DE DESENVOLVIMENTO DO EPICÓTILO E FORMAÇÃO DE CALO (1ª FASE); B- CALO FORMADO SOBRE EMBRIÃO ZIGÓTICO, SOBRE O QUAL HÁ FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM MEIO SEM REGULADORES DE CRESCIMENTO (2ª FASE); C E D- ASPECTOS DA INTENSA FORMAÇÃO (DIRETA E INDIRETA) DE EMBRIÕES SOMÁTICOS, EM VÁRIOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EM MEIO SEM REGULADORES DE CRESCIMENTO (3ª FASE); E- MASSA CELULAR COM EMBRIÕES SOMÁTICOS SENESCENTES, SOBRE OS QUAIS OCORRE FORMAÇÃO (DIRETA) DE EMBRIÕES, EM MEIO SEM REGULADORES DE CRESCIMENTO (4ª FASE – AMBIENTE ESCURO)..... 70

FIGURA 5. ASPECTOS DA FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS A PARTIR DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.): A- INTENSA FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS SOBRE EMBRIÕES SOMÁTICOS MAIS VELHOS, EM AMBIENTE COM LUZ EM MEIO COM 0,5 mg.L⁻¹ CIN + 0,05 mg.L⁻¹ ANA (4ª FASE); B- CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS, COM FORMAÇÃO DIRETA DE NOVOS EMBRIÕES SOMÁTICOS (5ª FASE); C- PLÂNTULAS NORMAIS E ANORMAIS DE EMBRIÕES SOMÁTICOS CONVERTIDOS (5ª FASE); D- PLÂNTULA EM FORMAÇÃO (5ª FASE); E- PLÂNTULA DESENVOLVIDA SOBRE MEIO LÍQUIDO EM SUBSTRATO DE ALGODÃO (5ª FASE); F- SEQÜÊNCIA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA ATÉ A FORMAÇÃO DA PLÂNTULA; G- PLÂNTULA DESENVOLVIDA E TRANSPLANTADA EM SUBSTRATO DE PLANTMAX® NA CASA DE VEGETAÇÃO..... 77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	PORCENTAGEM DE ESTACAS COM CALO NA BASE QUANDO SUBMETIDA AOS 2 SUBSTRATOS E AOS 7 TRATAMENTOS PARA A ESTAQUIA SEMI-LENHOSA DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.).....	47
TABELA 2.	PORCENTAGEM DE ESTACAS VIVAS QUANDO SUBMETIDA AOS 6 TRATAMENTOS, PARA A ESTAQUIA HERBÁCEA DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.).....	50
TABELA 3.	EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 1).....	51
TABELA 4.	EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 2).....	52
TABELA 5.	EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTIBIÓTICO CLORANFENICOL NO MEIO DE CULTURA PARA CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 3).....	53
TABELA 6.	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) (APÓS LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE POR 20 min E 10 s DE IMERSÃO EM ETANOL A 70%) NA DESINFESTAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES E SEGMENTOS NODAIS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) COLETADOS DE PLANTAS ADULTAS A CAMPO (TESTE 1).....	55

TABELA 7.	EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE (SEGUIDA DE IMERSÃO RÁPIDA EM ETANOL A 70%) E IMERSÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCI) POR 10 min NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) COLETADAS DE PLANTAS ADULTAS A CAMPO (TESTE 2).....	56
TABELA 8.	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCI) (APÓS IMERSÃO EM ETANOL A 70% POR 30 s) SOBRE A DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES E FRUTOS (DOS QUAIS FORAM ISOLADAS AS SEMENTES) DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) (TESTE 1).....	58
TABELA 9.	EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE BAP E AIB SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.).....	59
TABELA 10.	EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE AIB SOBRE O ENRAIZAMENTO DE MICRO-ESTACAS DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.).....	61
TABELA 11.	EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCI) A 5% E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP E AIB NO MEIO DE ISOLAMENTO NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS AXILARES DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) ISOLADOS COM 2 PRIMÓRDIOS FOLIARES DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 1).....	62
TABELA 12.	EFEITO DA IMERSÃO EM ETANOL 70% POR 10 s SEGUIDA DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCI) A 10% NO ISOLAMENTO EM MEIO COM 1,0 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ AIB NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS APICAIS DE BROTAÇÕES JOVENS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) COLETADAS DE ÁRVORES ADULTAS A CAMPO (TESTE 2).....	63

TABELA 13.	EFEITO DA IMERSÃO EM ETANOL 70% POR 10 s SEGUIDA DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCI) A 10% NO ISOLAMENTO EM MEIO COM 1,0 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ AIB NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS APICAIS DE BROTAÇÕES JOVENS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) COLETADAS DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 3).....	64
TABELA 14.	EFEITO DA COMBINAÇÃO DE BAP E 2,4-D NA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) APÓS 80 DIAS.....	69
TABELA 15.	PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E SEQÜÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA NA 1ª E 2ª FASE DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS, 200 DIAS APÓS O ISOLAMENTO.....	72
TABELA 16.	RESULTADOS OBTIDOS NA FASE DE DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS (4ª FASE) DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS, 340 DIAS APÓS O ISOLAMENTO.....	74

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS NÚMERO DE ESTACAS COM FORMAÇÃO DE CALO NA BASE, NÚMERO DE ESTACAS COM GEMAS INCHADAS, NÚMERO DE ESTACAS COM BROTAÇÕES, E NÚMERO DE ESTACAS VIVAS PARA A ESTAQUIA SEMI-LENHOSA DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.).....	79
ANEXO 2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS NÚMERO DE ESTACAS COM RETENÇÃO DE FOLHAS E NÚMERO DE ESTACAS VIVAS PARA A ESTAQUIA HERBÁCEA DE GUABIROBEIRA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Berg.).....	79
ANEXO 3. LAUDO OFICIAL DO CENTRO DE DIAGNÓSTICO MARCOS ENRIETTI.....	80
ANEXO 4. TABELAS COM OS RESULTADOS DOS TESTES DE DESINFESTAÇÃO 4, 5, 6 E 7 DA MICRO-ESTAQUIA DE PLANTAS NA CASA DE VEGETAÇÃO.....	81
ANEXO 5. TABELAS COM OS RESULTADOS DOS TESTES 2, 3, 4, 5 E 6 DE DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DA MICRO-ESTAQUIA DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS.....	83
ANEXO 6. TABELAS COM OS RESULTADOS DOS TESTES 4, 5, 6, 7 E 8 DE DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DA CULTURA DE MERISTEMAS.....	85
ANEXO 7. TABELAS COM OS RESULTADOS DOS TESTES 1, 2 E 3 DA PRIMEIRA FASE DE DESENVOLVIMENTO E MULTIPLICAÇÃO DE MERISTEMAS.....	88
ANEXO 8. TABELA COM O RESULTADO DO TESTE PRELIMINAR DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	89

RESUMO

A guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) é uma Mirtácea frutífera lenhosa nativa da região Sul do Brasil, cuja exploração comercial pode ser fomentada por estudos sobre sua propagação vegetativa. Foram empregadas diversas técnicas de propagação vegetativa com o objetivo de estudar o comportamento da espécie. O trabalho está dividido em duas fases: estaquia e micropropagação. Para a estaquia semi-lenhosa foram testados 2 tipos de substrato (100% Plantmax[®]; 2/3 Plantmax[®] + 1/3 areia) e 7 tratamentos (água; ETANOL 50%; ETANOL 20%; ETANOL 40%; AIB 500 mg.L⁻¹; AIB 1.000 mg.L⁻¹; AIB 2.000 mg.L⁻¹). Para a estaquia herbácea foram testados 6 tratamentos (testemunha, água; ETANOL 50%; AIB 1.000 mg.L⁻¹; AIB 5.000 mg.L⁻¹; AIB 10.000 mg.L⁻¹) e 2 tempos de imersão (30 s e 2 h). Não houve formação de raízes em nenhum dos experimentos. Na micropropagação a fonte de explantes foram plantas em casa de vegetação e plantas adultas a campo. Em todos os experimentos a desinfestação foi baseada em etanol e NaOCl comercial e o meio de cultura foi o MS. Os experimentos com micro-estacas de campo ou casa de vegetação não passaram da fase de desinfestação, devido à contaminação bacteriana endógena. A micro-estaquia de plântulas assépticas utilizou explantes de sementes germinadas *in vitro* a partir de sementes retiradas de frutos maduros ou iniciando a maturação. A desinfestação foi realizada sobre os frutos ou sobre as sementes já separadas da polpa e ambas as formas foram eficientes. O teste de multiplicação mostrou que o meio sem reguladores de crescimento apresentou brotações mais longas, enquanto o meio acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP apresentou maior número de brotações por estaca. Houve formação de raiz em meio sem reguladores de crescimento. Na cultura de meristemas foram utilizados meristemas apicais e axilares. Os resultados demonstraram ser possível a eliminação da contaminação bacteriana, mas não houve desenvolvimento e multiplicação dos meristemas. A embriogênese somática foi induzida sobre embriões zigóticos desenvolvidos, retirados de frutos em fase inicial de maturação. Foram realizados testes com diversas combinações de reguladores de crescimento (2,4-D, ANA, AIB, BAP e 2i-P) em várias concentrações, visando otimizar as fases da embriogênese, da indução à conversão. Na fase de indução a formação de embriões somáticos ocorreu nos meios com 0,5 a 1 mg.L⁻¹ 2,4-D. As fases seguintes mostraram que é possível a diminuição ou retirada do regulador de crescimento, o que estimula o ciclo repetitivo e permite o desenvolvimento e conversão dos embriões somáticos. Foi observada a formação de embriões somáticos de forma indireta e direta. Houve conversão de embriões somáticos em plântulas e várias passaram para a aclimatização.

ABSTRACT

The guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) is a native woody fruitful Myrtacea of the South region of Brazil, whose commercial exploration can be fomented by studies about its vegetative propagation. Several techniques of vegetative propagation were used with the objective of studying the behavior of the species. The work is divided in two phases: cutting and micropropagation. For the semi-woody cutting 2 substratum types were tested (100% Plantmax[®] ; 2/3 Plantamax[®] + 1/3 sand) and 7 treatments (water; ethanol 50%; ethanol 20%; ethanol 40%; IBA 500 mg.L⁻¹; IBA 1.000 mg.L⁻¹; IBA 2.000 mg.L⁻¹). For herbaceous cutting 6 treatments were tested (control, water; ethanol 50%; IBA 1.000 mg.L⁻¹; IBA 5.000 mg.L⁻¹; IBA 10.000 mg.L⁻¹) and 2 times of immersion (30 s and 2 hs). there was no formation of roots in none of the experiments. In the micropropagation, the explants source were plants in green house and adult plants from the field. In all the experiments the desinfesting was based on ethanol and commercial NaOCl and the culture medium was the MS. The experiments with field or green house microcuttings didn't pass of desinfesting phase, due to the bacterial endogenous contamination. The microcuttings of aseptic plantlets used explants of in vitro germinated seeds from mature fruits or fruits beginning the maturation. The desinfestation was accomplished on fruits or on seeds already separated from the pulp and both forms were efficient. The multiplication test showed that the medium without growth regulators presented longer budding, while the medium with 0,5 mg.L⁻¹ of BAP presented larger budding number by cutting. There was root formation in the medium without growth regulators. In the meristems culture, apical and axillary meristems were used. The results demonstrated to be possible the elimination of the bacterial contamination, but there were no development and multiplication of the meristems. The somatic embryogenesis was induced on developed zygotic embryos, removed from fruits in the initial phase of maturation. Tests were accomplished with several combinations of growth regulators (2,4-D, ANA, IBA, BAP and 2i-P) in several concentrations, seeking optimizing the phases of the embryogenesis, from induction to the conversion. In the induction phase the formation of somatic embryos occurred in the medium with 0,5 to 1 mg.L⁻¹ 2,4-D. The following phases showed that is possible to decrease or retreat the growth regulator, what stimulates the repetitive cycle and allows the development and conversion of the somatic embryos. The formation of somatic embryos in an indirect and direct way was observed. There was conversion of somatic embryos in plantlets and several passed to the climate adaptation phase in green house.

1 INTRODUÇÃO

A guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) é uma Mirtácea frutífera lenhosa nativa da região Sul do Brasil. Produz frutos saborosos e aromáticos, que podem ser aproveitados para consumo *in natura* ou processados.

Apesar de seus frutos serem bastante apreciados, não existem plantações comerciais desta espécie. Não existem, também, pesquisas sobre a sua propagação vegetativa, visando uma futura exploração comercial desta espécie.

Existem vários métodos de propagação vegetativa normalmente empregados para espécies frutíferas lenhosas: estaquia, enxertia, mergulhia e micropropagação. A reprodução sexuada apresenta a desvantagem da segregação genética. Porém, as Mirtáceas apresentam muita dificuldade para a propagação vegetativa, especialmente pela oxidação de compostos fenólicos na região de corte (FACHINELLO et al., 1995).

A pesquisa de formas de propagação vegetativa para uma nova espécie com potencial para exploração comercial pode despertar o interesse de produtores para o seu cultivo e exploração do mercado. As respostas práticas não são imediatas, mas o estudo desta espécie a longo prazo pode trazer grandes benefícios. Além da possibilidade de exploração comercial dos frutos de uma espécie perfeitamente adaptada à região, ela tem destaque dentro da mata dos

pinhais do Sul do Brasil, o que leva ao interesse de sua preservação dentro do sistema ecológico no qual está inserida.

A produção de frutas tropicais e subtropicais vem aumentando significativamente mais do que a produção de frutas temperadas. Embora existam métodos eficientes de propagação vegetativa para a maioria das frutíferas tropicais e subtropicais cultivadas, a rápida expansão das plantações tem sido impedida pela séria escassez de material clonal, principalmente de cultivares superiores (LITZ e JAISWAL, 1990).

O plantio de extensos novos pomares de clones de frutíferas tropicais propagados vegetativamente tem sido, algumas vezes, limitado por patógenos que afetam drasticamente a produção (LITZ e JAISWAL, 1990).

Muitas espécies frutíferas têm sido micropropagadas por meio da proliferação de gemas axilares, de ápices caulinares e de segmentos nodais. A maioria destas espécies frutíferas são herbáceas ou arbóreas. Elas respondem rapidamente *in vitro*. Para as espécies lenhosas há problemas como oxidação de compostos fenólicos e ausência de juvenilidade em árvores clonadas adultas (LITZ e JAISWAL, 1990).

Aplicando diversas técnicas de propagação será possível apontar um ou mais caminhos a serem explorados para a obtenção de mudas de guabirobeira, porque a exploração comercial de frutíferas nativas apresenta boas perspectivas e a propagação vegetativa é a técnica mais aplicável para a produção de mudas.

O objetivo geral deste trabalho foi propagar vegetativamente a guabirobeira, através do emprego de diversas técnicas, descrevendo os resultados obtidos em cada etapa, como informações preliminares para um estudo mais aprofundado e direcionado.

Os objetivos específicos foram: testar a eficiência do etanol e do AIB no enraizamento de estacas semi-lenhosas e herbáceas de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.); testar a eficiência de métodos de desinfestação no isolamento de explantes para a propagação *in vitro* por micro-estaquia, cultura de meristemas e embriogênese somática; encontrar a melhor combinação de reguladores de crescimento para a multiplicação e enraizamento das micro-estacas obtidas de plântulas assépticas; definir um protocolo para a micropropagação pela cultura de meristemas; definir a melhor combinação de reguladores de crescimento para as diversas fases da embriogênese somática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DE *Campomanesia xanthocarpa* Berg.

Pelo sistema de classificação de CRONQUIST (1988), a guabirobeira é classificada da seguinte forma:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Myrtales

Família: Myrtaceae

Gênero: *Campomanesia*

Espécie: *xanthocarpa*

A *Campomanesia xanthocarpa* Berg. é conhecida vulgarmente por guabirobeira, guabirobeira do mato, gabirobeira, gabiropa (SIMÃO, 1971).

Segundo SIMÃO (1971) é uma árvore mediana, de 10 a 20 m de altura e comumente com um diâmetro de 30 a 50 cm, glabra. Tronco geralmente tortuoso com caneluras na base e que por vezes se estendem ao longo de todo o mesmo; muitas vezes provido de raízes tabulares. A copa é densa e arredondada, semidecidual. Folhas variáveis em tamanho e forma, oscilando entre 3,5 - 8,0 cm de

comprimento por 2,5 - 4,5 cm de largura, oval-oblongas a oblongas, geralmente cunhadas para a base, largas para a parte mediana do limbo e com o ápice acuminado-agudo ou muito agudo. Esta espécie se distingue por seus pecíolos longos, cuja maioria oscila entre 6-11 mm. Pedúnculos unifloros ou reunidos sobre pequenos ramos laterais, medindo de 1,0 a 3,5 cm. Cálice pentâmero, um pouco pubescente interiormente e com bordos ciliados. Pétalas obovadas de aproximadamente 1 cm. Estames com cerca de 8 mm, caducos. Disco glabro e plano ou um pouco deprimido, com um estilete de 5 mm ou pouco mais com estigma capitado-peltado. Ovário com 6 a 8 lóculos.

Floresce durante os meses de setembro, outubro e novembro, com frutos maduros a partir de outubro (SIMÃO, 1971). O fruto é uma baga glabra, amarela, de 1 a 2 cm de diâmetro (CORRÊA, 1984).

A guabirobeira possui vasta e expressiva distribuição por toda a região dos pinhais do planalto meridional do Sul do Brasil, ocorrendo menos freqüentemente também na "mata branca" e como árvore rara e esparsa na mata pluvial da encosta atlântica do Sul do Brasil. Também é encontrada na floresta latifoliada da Bacia do Rio Uruguai, porém com distribuição mais irregular e descontínua. É uma espécie seletiva higrófito e mesófito até heliófito. É mais abundante em solos úmidos e compactos das sub-matas dos pinhais, capões e matas de galeria, chegando por vezes, a ser uma das sub-dominantes nas submatas mais abertas, sobretudo em áreas onde os solos são bastante úmidos. No Brasil é encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SIMÃO, 1971).

Os frutos possuem polpa aromática e agradável ao paladar humano. Também são muito apreciados por animais domésticos ou selvagens. Além disto, fornece madeira branca, bastante resistente. A lenha é apreciada para a sapecagem e torrefação da erva-mate, pois desprende um aroma agradável durante a combustão. As folhas encerram matéria amarela amarga, matéria gomosa, clorofila e ácido tânico, sendo utilizadas como adstringentes e úteis contra o catarro da bexiga e da uretra. As flores são muito visitadas por abelhas (CORRÊA, 1984).

2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ESTAQUIA

O objetivo da propagação vegetativa é conseguir uma progênie de genótipo idêntico ao de uma única planta matriz. O processo biológico é conhecido como clonagem e a população resultante é chamada clone. As vantagens da propagação vegetativa clonal incluem: a) fixar genótipos superiores; b) uniformizar as populações; c) reduzir o tempo até a floração; d) combinar mais de um genótipo numa única planta; e) controlar as fases do desenvolvimento; f) facilitar a propagação, uniformizando-a no tempo (HARTMANN et al., 1997).

A viabilidade do uso da estaquia na propagação comercial depende da facilidade de enraizamento de cada espécie, da qualidade do sistema radicular formado e da resposta da planta na área de produção. Os fatores que afetam o enraizamento podem ser divididos em internos: condição fisiológica da planta matriz, idade da planta, tipo de estaca, época do ano, potencial genético de enraizamento, sanidade, balanço hormonal e oxidação de compostos fenólicos; e externos:

temperatura, luz, umidade, substrato e condicionamento (tratamento com reguladores de crescimento, anelamento, estiolamento, dobra de ramos, entre outros) (FACHINELLO et al., 1995).

Entre os fatores endógenos, os reguladores de crescimento (balanço hormonal) são de grande importância. O grupo de reguladores de crescimento que apresenta o maior efeito na formação de raízes em estacas são as auxinas. A auxina é sintetizada nas gemas apicais e folhas novas, de onde é translocada para a base da planta (FACHINELLO et al., 1995). A presença de gemas é essencial para o enraizamento das estacas. A presença de folhas também exerce um efeito positivo sobre o enraizamento de estacas. Entretanto, enquanto a presença de folhas pode ser importante para o enraizamento, a retenção destas folhas é mais uma consequência do enraizamento do que uma causa direta do enraizamento. As folhas produzem carboidratos, que são translocados para a base da estaca, são importantes para o desenvolvimento das raízes. Entretanto, o principal efeito das gemas e folhas na promoção do enraizamento é decorrente da produção de auxina (HARTMANN et al., 1997).

Quanto à época do ano mais adequada para a obtenção das estacas, há diferenças entre as espécies. Algumas têm melhores resultados na primavera e outras da primavera até fins do outono. Em algumas espécies, especialmente as pertencentes à família das Mirtáceas, o enraizamento pode ser dificultado pela oxidação de compostos fenólicos na região do corte da estaca (FACHINELLO et al., 1995).

Entre os fatores externos de condicionamento, as auxinas sintéticas são muito utilizadas no enraizamento de estacas. O ácido indolilbutírico (AIB) apresenta as

seguintes vantagens: fotoestabilidade, ação localizada, ação persistente e não tóxica em ampla gama de concentrações e não é atacado por ação biológica. O aumento da concentração exógena de auxina aplicada em estacas provoca efeito estimulador de indução de raízes até um valor máximo, a partir do qual qualquer acréscimo de auxinas têm efeito inibitório. O AIB é mais eficiente no enraizamento de estacas do que o ácido indolacético (AIA) (FACHINELLO et al., 1995).

Ainda não se sabe quanto tempo os reguladores de crescimento permanecem sem perder sua atividade. O AIA é rapidamente destruído em soluções não estéreis, por exemplo, pelo *Acetobacter*, mas o mesmo organismo não tem efeito sobre o AIB (HARTMANN et al., 1997).

Segundo HARTMANN et al. (1997), o etileno (C_2H_4) pode melhorar, diminuir ou não ter efeito sobre a formação de raízes adventícias. A promoção do enraizamento pelo etileno ocorre mais freqüentemente em plantas intactas do que em estacas, mais em plantas herbáceas do que nas lenhosas e em plantas que possuem primórdios radiculares pré-formados. ZANETTE (1995) concluiu que o etanol apresenta efeito estimulador no enraizamento de estacas lenhosas de pereira 'Garber' e foi eficaz no enraizamento quando as estacas foram tratadas por imersão de 30 s em solução a 20% (v/v).

A imersão rápida em solução concentrada é um dos métodos mais utilizados para a aplicação do reguladores de crescimento. Neste método, é preparada uma solução com concentração entre 500 a 10.000 $mg.L^{-1}$ de auxina, em solução aquosa ou com 50 % de etanol, onde a base das estacas são mergulhadas por curto tempo (geralmente 5 segundos) (HARTMANN et al., 1997).

A perda de água é uma das principais causas da morte de estacas por fator externo. A prevenção do murchamento é especialmente importante em espécies que exigem um longo tempo para formar raízes e nos casos em que são utilizadas estacas com folhas e/ou de consistência herbácea. O uso da nebulização intermitente permite a diminuição da perda de umidade, além da redução da temperatura (FACHINELLO et al., 1995).

HARTMANN et al. (1997) citam algumas características importantes dos substratos para enraizamento de estacas: a) deve ser suficientemente firme e denso para suportar as estacas durante o enraizamento (seu volume deve ser aproximadamente constante quando seco ou molhado); b) deve ser bem decomposto para evitar a imobilização do nitrogênio e o encolhimento excessivo; c) não deve ser muito hidrofóbico e deve reter umidade suficiente para reduzir a frequência de rega; d) deve ser suficientemente poroso para permitir o escoamento do excesso de água e uma oxigenação adequada; e) deve ser isento de sementes de plantas daninhas, nematóides e outros patógenos; f) o nível de salinidade não deve ser alto; g) deve ter uma alta capacidade de troca catiônica (CTC) para reter os nutrientes aplicados; h) deve ser de qualidade constante; e i) deve ser de fácil obtenção e de custo acessível.

Em estacas de plantas lenhosas perenes, as raízes adventícias se originam, geralmente, a partir de células vivas do parênquima, no floema secundário jovem, mas algumas vezes também nos raios vasculares, câmbio, floema, calo ou lenticelas. Há, portanto, dois padrões de formação de raízes adventícias: formação direta de raízes a partir de células próximas ao sistema vascular (geralmente em espécies de fácil enraizamento); e formação indireta de raízes, onde há divisão

desordenada de células, incluindo a formação de calo, antes do início ordenado de divisão celular para iniciar a formação de primórdios de raízes adventícias (HARTMANN et al., 1997).

Barreiras estruturais na estaca, como um anel de esclerênquima contínuo, podem ser a causa da dificuldade de enraizamento de algumas espécies. Mas, para a maioria das espécies de difícil enraizamento, a estrutura da estaca não influencia o potencial de enraizamento. Além disto, tratamentos com auxinas e enraizamento sob nebulização causam considerável expansão e proliferação celular no córtex, floema e câmbio, resultando na quebra do anel de esclerênquima. O enraizamento está relacionado ao potencial genético e às condições fisiológicas para a formação de primórdios radiculares, e não às restrições mecânicas de um anel de esclerênquima (HARTMANN et al., 1997).

DUARTE (1991)¹, citado por FACHINELLO et al. (1995), obteve até 31,6% de estacas enraizadas de goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.), utilizando AIB em imersão rápida na dosagem de 5.000 mg.L⁻¹.

Estacas herbáceas e lenhosas de goiabeira, com ou sem folhas foram tratadas com soluções de AIB a 100 ou 200 mg.L⁻¹ por 24 minutos (min) e a 1.000 ou 1.500 mg.L⁻¹ por 1 min. As estacas herbáceas e as estacas não tratadas não enraizaram; o melhor enraizamento ocorreu em estacas lenhosas, sem folhas, tratadas com AIB a 200 mg.L⁻¹ (SHARMA, 1975).

¹ DUARTE, O.R. Efeito da época e do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de estacas semi-lenhosas de goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). Pelotas, 1991. 68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.

2.2.1 Estaquia semi-lenhosa

Estacas semi-lenhosas são aquelas coletadas no final do verão e início do outono. Em geral, o termo refere-se a estacas com folhas e mais lignificadas do que as estacas herbáceas. Porém, alguns autores consideram estacas semi-lenhosas aquelas que provêm de ramos não lignificados, oriundos de plantas lenhosas (FACHINELLO et al., 1995). HARTMANN et al. (1997) definem estacas semi-lenhosas com aquelas retiradas de espécies lenhosas perenifólias e de plantas decíduas com madeira com maturação parcial. Geralmente possuem entre 7,5 e 15 cm de comprimento com manutenção de folhas na extremidade superior. O corte inferior é, geralmente, feito logo abaixo do nó inferior.

Muitas vezes é observada a formação de calo na base da estaca. Observa-se que, ao menos para algumas espécies de difícil enraizamento, a formação de raízes se dá sobre o calo, ainda que a formação de calo não seja um prenúncio seguro da formação de raízes adventícias. A localização das raízes adventícias é variável entre as espécies: na base da estaca, em nós ao longo do caule e nos entrenós. O calo é um tecido cicatricial, formado por células parenquimáticas formando um tecido pouco diferenciado, que pode surgir a partir do câmbio vascular, do córtex ou da medula (FACHINELLO et al., 1995).

A Mirtácea frutífera mais estudada na estaquia semi-lenhosa é a goiabeira (*Psidium guajava* L.). TREEBY (1983), estudou o enraizamento em estacas coletadas no início do inverno, tratadas com AIB (0, 500, 2.500, 5.000 mg.L⁻¹) por 1, 5 ou 15 min e colocadas para enraizar sob nebulização intermitente por 6 semanas. A porcentagem de enraizamento aumentou em 30,5% no tratamento com a maior

concentração, em relação à testemunha, sendo que o tempo de aplicação não foi significativo. BACARIN et al. (1994) usaram soluções de AIB a 0, 100 e 200 mg.L⁻¹ durante 8, 10 ou 14 horas para indução do enraizamento em estacas com dois nós e um par de folhas inteiras, em substrato de vermiculita e sob nebulização. Nos dois cultivares testados, o melhor enraizamento (94,6 - 95,5%) ocorreu com o AIB a 100 mg.L⁻¹.

2.2.2 Estaquia herbácea

Estacas herbáceas são as coletadas no período de crescimento vegetativo, quando os tecidos apresentam alta atividade meristemática e baixo grau de lignificação (FACHINELLO et al., 1995).

Para algumas espécies de difícil enraizamento, a estaquia herbácea pode ser o único método comercial para a propagação clonal de cultivares. Geralmente, estacas herbáceas enraizam mais fácil e rapidamente. Este tipo de estaca sempre é feito com a manutenção de folhas e geralmente respondem bem ao tratamento com auxina (HARTMANN et al., 1997).

Diversos autores pesquisaram a estaquia herbácea em goiabeira (*Psidium guajava* L.). TAVARES (1994)², citado por FACHINELLO et al. (1995), obteve a maior percentagem de enraizamento (51,5%) com estacas herbáceas apicais com um par de folhas, mantidas durante 60 dias em ambiente com nebulização intermitente. O melhor resultado obtido por RATHORE et al. (1975), após tratamento

² TAVARES, M.S.W. **Propagação de goiabeira (*Psidium guajava* L.) através de estacas**. Pelotas, 1994. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.

das estacas com imersão rápida em AIB, AIA ou ácido naftalenoacético (ANA) (0-20.000 mg.L⁻¹), foi com AIA, seguido do AIB, ambos a 2.500 mg.L⁻¹. PEREIRA et al. (1983) testaram o enraizamento de diferentes tipos de estacas e os melhores resultados foram obtidos com estacas herbáceas com 2 nós e 4 folhas tratadas com 2.000 mg.L⁻¹ de ANA. Em outro trabalho, PEREIRA et al. (1991) trataram estacas herbáceas de goiabeira, com dois nós e um par de folhas, com AIB em 4 concentrações por 14 h no escuro, colocando-as para enraizar em vermiculita. O enraizamento foi observado após 45 dias e os melhores tratamentos foram 100 e 200 mg.L⁻¹.

Trabalhando com goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.), FIGUEIREDO et al. (1995) conseguiram no máximo 20,7% de enraizamento das estacas, num tratamento onde estas foram coletadas de mudas em maio, após estiolamento por 60 dias, sem AIB. Os mesmos autores concluíram que, num experimento com estacas estioladas por 40 ou 60 dias e tratadas com AIB (0-11.000 mg.L⁻¹), o AIB, em todas as concentrações, reduziu o enraizamento, mas o estiolamento aumentou a formação de raízes.

BIASI et al. (1998) obtiveram 40 % de enraizamento em estacas apicais de goiabeira 'Supreme' após imersão de 12 h em solução com 50 mg.L⁻¹ de ANA. Todas as estacas possuíam 2 nós e 1 par de folhas cortadas ao meio.

2.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO*

Cultura de tecidos é o termo usado para o conjunto de procedimentos usados para manter e cultivar tecidos vegetais (calos, células, protoplastos) e órgãos

(ramos, raízes, embriões) em cultura asséptica (ou *in vitro*). Micropropagação é a propagação de plantas *in vitro*. Esta é dividida em 4 estádios específicos: estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização. A parte da planta usada para iniciar a micropropagação ou cultura de tecidos é chamado explante. O processo de desenvolver brotos e raízes adventícios é chamado organogênese e leva ao desenvolvimento de uma estrutura unipolar (primórdio de caule ou raiz), cujo sistema vascular geralmente está ligado ao tecido matriz (HARTMANN et al., 1997).

A cultura de tecidos é baseada nos princípios da totipotência, que afirma que cada célula viva é capaz de reproduzir um organismo inteiro, já que possui toda a informação genética necessária (HARTMANN et al., 1997). Conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida de três maneiras: 1) multiplicação através da proliferação de gemas axilares; 2) multiplicação através da indução de gemas adventícias por organogênese; e 3) multiplicação através de embriogênese somática.

Hormônios vegetais fazem a regulação do crescimento e desenvolvimento dentro das plantas. Os cinco principais grupos de hormônios são as auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. Além destas, certas substâncias químicas, algumas naturais outras sintéticas, possuem efeitos hormonais quando aplicados exogenamente às plantas. Estas substâncias, juntamente com os hormônios naturais, constituem os reguladores de crescimento das plantas (HARTMANN et al., 1997).

As fases de desenvolvimento de uma planta oriunda de semente são tradicionalmente identificadas como: juvenil, de transição e adulta. Cada fase tende a ter potenciais regenerativos característicos. Embriões, por exemplo, tendem a ser

embriogênicos, isto é, proliferar iniciando novos embriões. O ciclo de vida de plantas clonais apresenta características biológicas e morfológicas diferentes, dependendo da competência dos tipos de propágulos utilizados na clonagem. Outro sistema que não envolve a recombinação sexual é o ciclo apomítico. Neste sistema, um embrião se forma diretamente a partir de uma célula haplóide ou diplóide presente na estrutura reprodutiva (HARTMANN et al., 1997).

2.3.1 Meios de cultura

As formulações de meios de cultura para o cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais geralmente envolvem o uso do meio de cultura básico de MURASHIGE e SKOOG (1962), embora o meio de cultura WPM (Woody Plant Medium) (LLOYD & McCOWN, 1980) também seja usado (LITZ e JAISWAL, 1990).

A maioria das espécies frutíferas têm sido micropropagada em meio de cultura solidificado com ágar (LITZ e JAISWAL, 1990).

Está bem claro que a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é o regulador de crescimento essencial para a multiplicação de segmentos nodais e ápices caulinares (LITZ e JAISWAL, 1990).

PASQUAL e BARROS (1991) obtiveram que a proliferação de brotações propagadas *in vitro* de um porta enxerto de pereira aumentou com a presença de BAP em concentrações até $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Quanto ao alongamento das brotações, o trabalho mostrou que a auxina ANA, isoladamente, apresentou resultados significativos apenas para o alongamento das brotações. A auxina, na ausência da citocinina, não resulta em maior proliferação das brotações.

2.3.2 Contaminação *in vitro*

A contaminação em cultura de tecidos pode ser oriunda de 2 fontes: pelo carregamento de microorganismos na superfície ou dentro dos tecidos dos explantes, ou por procedimentos errados no laboratório (CASSELLS, 1990).

As plantas podem, portanto desenvolver “floras” endofíticas compostas por várias espécies, consistindo de microorganismos inter e intracelulares, incluindo vírus, viróides, bactérias e agentes semelhantes a bactérias e fungos. Ao estabelecer culturas de tecidos, dependendo do explante usado, microorganismos superficiais ou endofíticos podem ser carregados para dentro da cultura. Na cultura de meristemas, dependendo do tamanho do meristema isolado, a maioria dos organismos serão eliminados, enquanto que nos explantes de folhas, pecíolos e hastes, a maioria, se não todos os microorganismos nos tecidos serão levados junto. Tecidos vegetais com resposta mais lenta no meio de cultura são rapidamente sobrepostos por microorganismos que se adaptam facilmente ao meio de cultura. Microorganismos menos adaptados ao meio de cultura podem continuar proliferando nos tecidos do explante. Estes podem causar o efeito de ‘halo’ ao redor do explante, que pode ser visto ao ser colocado contra a luz (CASSELLS, 1990).

Segundo CASSELLS (1990), muito cuidado deve ser tomado na seleção de explantes, para evitar as fontes de explantes que abrigam microorganismos com mais facilidade e que, em virtude das características da superfície do explante, podem escapar dos efeitos dos desinfestantes de superfície. No caso de microorganismos endofíticos, a colonização pode ser localizada ou até sistêmica. Estes microorganismos endofíticos intercelulares escapam dos efeitos dos

desinfestantes de superfície. Uma outra classe de microorganismos endofíticos são as formas intracelulares, que incluem os vírus, viróides e procariontes (bactérias).

A maior fonte de contaminação na cultura de tecidos é a planta doadora. A contaminação por uso de técnicas inadequadas ou procedimentos errados é potencialmente controlável. Devem ser descartadas as matrizes altamente contaminadas. Porém, é mais fácil identificar a contaminação em tecidos adultos da planta matriz, onde há expressão dos sintomas, do que em culturas *in vitro*, onde a população e os sintomas são suprimidos (CASSELS, 1990).

O condicionamento da planta matriz é muito importante para o estabelecimento asséptico de culturas de ápices caulinares e segmentos nodais de algumas espécies (LITZ e JAISWAL, 1990).

Bactérias endógenas de crescimento lento podem ter origem no explante inicial, aparecendo algumas semanas após o isolamento. A utilização de antibióticos no meio nutritivo é interessante para o controle de contaminações bacterianas endógenas. Entretanto, sabe-se que, mesmo com antibióticos, dificilmente as bactérias são totalmente eliminadas, pois os antibióticos mais utilizados em cultura de tecidos vegetais são bacteriostáticos e não bactericidas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Alguns cuidados devem ser tomados quanto ao uso de antibióticos em plantas e tecidos de plantas, pois a aplicação de antibióticos é proibida ou restringida em alguns países. Além disto, é necessário determinar a concentração inibitória mínima, antes que o antibiótico seja aplicado. O risco em se usar produtos antifúngicos, antibacterianos e antivirais é que o modo de ação destes pode ser biostático e não biocida (CASSELS, 1990).

A contaminação microbiana de explantes nucelares ou ovulares não tem sido um grande problema; o nucele não tem conexão vascular com o tecido materno. Geralmente, é suficiente a desinfestação dos frutos ou flores (LITZ e JAISWAL, 1990).

BARROS e PASQUAL (1991), em seu trabalho sobre a contaminação *in vitro* de explantes de café, concluíram que o NaOCl não exerce efeito significativo no controle da contaminação bacteriana e que maiores concentrações de NaOCl promovem menores taxas de contaminação fúngica, porém, aumenta a oxidação dos explantes.

FOSSARD e FOSSARD (1988) trabalhando com *Eucalyptus*, tiveram perdas consideráveis devido à contaminação microbiana nas culturas com explantes retirados de árvores adultas. A contaminação foi controlada usando técnicas como o ferimento da base da árvore, o uso de defensivos, o ensacamento das mudas da rebrota, retirando os explantes e submetendo-os a condições relativamente secas e higiênicas antes do isolamento, a desfolha, a lavagem em água corrente por 1 hora, o tratamento com soluções cloradas com 1% (v/v) de cloro livre e , principalmente, uma imersão final do explante nesta solução antes do isolamento em meio de cultura estéril.

BIASI (1993) verificou contaminação bacteriana endógena por *Acinetobacter anitratum* no cultivo *in vitro* de abacateiro e obteve inibição do crescimento de colônias, com doses de antibiótico superiores a 50 mg.L⁻¹. Entretanto, concentrações elevadas do antibiótico cloranfenicol podem ter efeitos fitotóxicos, conforme observado por POLLOCK et al. (1983) para *Nicotiana plumbaginifolia*, PHILLIPS et al. (1981) para *helianthus tuberosus*, OKKELS e PEDERSEN (1988) para beterraba e cenoura e BIASI (1993) para o abacateiro.

As substâncias mais comuns utilizadas na desinfestação dos explantes são o etanol e compostos a base de cloro, como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Comumente são adicionadas algumas gotas de detergente às soluções a base de cloro para melhorar o contato com os tecidos. O mais utilizado é o Tween 20, em concentrações de 0,01 a 0,05% (v/v) (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

As concentrações das soluções e os tempos de exposição variam conforme a sensibilidade do tecido a ser desinfestado. As concentrações mais eficientes do etanol são 70% e 80% (v/v) e o tempo de exposição é, em geral, de algumas dezenas de segundos. As concentrações mais comuns de cloro vão de 0,5 a 2,0% de cloro ativo e o tratamento dura até 40 min, no caso de tecido lignificado. Se o material for coletado a campo, pode ser mantido em água corrente por algumas horas para lavagem superficial (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

2.3.3 Micro-estaquia

A cultura de micro-estacas é como uma estaquia em miniatura baseada na proliferação de gemas axilares. A micro-estaquia se baseia na cultura de segmentos nodais colocados verticalmente no meio de cultura. As gemas axilares nos nós crescem no seu comprimento. Este padrão é repetido cortando-se novamente em segmentos nodais a cada subcultura. As partes aéreas produzidas são em seguida enraizadas e transplantadas. Plântulas desenvolvidas desta forma tendem a ser fiéis na reprodução do genótipo da planta matriz, porque o sistema envolve meristemas já existentes (HARTMANN et al., 1997; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A goiabeira foi propagada com sucesso a partir de segmentos nodais de plantas adultas, em meio de cultura MS suplementado com 4,5 μM de BAP sozinho ou acrescido de AIB ou ácido giberélico (GA_3) (AMIN e JAISWAL, 1987).

Também são utilizados, como fonte de explantes, ápices e gemas laterais de plântulas germinadas em condições assépticas, embriões e tecidos da semente. Porém, é um genótipo desconhecido, pois é resultado de recombinação gênica. Explantes de plântulas, entretanto, apresentam vantagens como a grande disponibilidade de explantes sem contaminação e a pronta capacidade de crescimento e resposta à aplicação de fitorreguladores dos tecidos juvenis (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

MOHAMED YASSEEN et al. (1995) estudaram a micro-estaquia a partir de plântulas assépticas. Sementes de goiaba cv. Red Indian germinaram em meio de cultura MS com ou sem BAP. Segmentos nodais das brotações laterais foram cultivados em meio de cultura de multiplicação com 4,4 μM de BAP, formando brotações múltiplas (3,5) em 4 semanas. A adição de ANA não afetou a multiplicação. O enraizamento foi feito em meio de cultura com carvão ativado ou 9,8 μM de AIB. O meio de cultura com AIB apresentou maior índice de enraizamento e com maior quantidade de raízes, mas os brotos foram menores do que os obtidos no meio de cultura com o carvão ativado. Cerca de 80% das plântulas enraizadas sobreviveram na casa de vegetação e produziram plantas fenotipicamente normais.

O enraizamento *in vitro*, geralmente, é melhor em meio de cultura com a formulação básica diluída, pois altas concentrações de sais tendem a inibir a formação de raízes. As variáveis que mais influenciam o enraizamento são o tipo e concentrações de auxina. Quando a concentração de auxina no meio de

enraizamento é excessiva, ocorre formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e a formação da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Segundo HARTMANN et al. (1997), as respostas às auxinas não são universais. Certas espécies enraizam com dificuldade, ou não enraizam, mesmo na presença de auxinas, indicando que outros fatores também influem no processo.

2.3.4 Cultura de meristemas

A cultura de meristemas utiliza a menor parte do ápice caulinar como explante, incluindo o meristema e alguns primórdios foliares associados. É um dos procedimentos utilizados para eliminar patógenos de partes da planta pois geralmente é livre de vírus e outros patógenos, mesmo em plantas com contaminação sistêmica. Meristemas de 0,10 a 0,15 mm eliminam os vírus em 100%, sendo que esta porcentagem diminui à medida que o tamanho aumenta para 1 mm. Por outro lado, quanto menor o explante, mais difícil o seu estabelecimento e menor a taxa de sobrevivência (HARTMANN et al., 1997).

O tamanho é importante caso se queira eliminar algum microorganismo sistêmico como vírus, bactéria ou micoplasma; quanto menor o explante isolado, ou quanto mais isolado das regiões subjacentes vascularizadas, maior a chance de sucesso (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Muitas vezes, explantes muito pequenos não conseguem ou demoram muito para crescer. ALTMAN e GOREN (1977), trabalhando com *Citrus sinensis*, observaram que gemas laterais pequenas, cultivadas isoladas, não brotaram,

enquanto que explantes maiores contendo partes de caule cresceram formando partes aéreas bem desenvolvidas.

RIBAS (1991) isolou meristemas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) em meio de cultura MS contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 . Os melhores resultados foram obtidos na multiplicação em meio de cultura acrescido de 1 mg.L^{-1} de BAP.

2.3.5 Embriogênese somática

Embriogênese somática é o desenvolvimento de embriões a partir de células vegetativas (somáticas) ao invés da união de gametas feminino e masculino para produzir um zigoto (SCHULTHEIS et al., 1990; HARTMANN et al., 1997).

Os principais fatores que influenciam a embriogênese somática são o tipo de explante, o estágio de desenvolvimento do explante e a interação entre o explante e o meio de cultura (LITZ e JAISWAL, 1990).

Existem dois padrões de desenvolvimento de embriogênese somática *in vitro*: 1) direto: os embriões se originam diretamente a partir dos tecidos, na ausência de calo; 2) indireto: ocorre a proliferação de calo como pré-requisito para o desenvolvimento de embriões (SHARP et al., 1980).

Meios com alta concentração salina, como o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), têm sido usados pelos efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento de embriões somáticos. Geralmente são empregados pelo menos dois diferentes meios de cultura. O primeiro é otimizado visando à indução da embriogênese somática, enquanto que o segundo meio objetiva permitir o desenvolvimento dos embriões

somáticos. As condições que favorecem a primeira fase geralmente inibem a segunda (GUERRA et al., 1999).

Para a maioria das espécies é utilizado o meio de cultura básico MS, geralmente com a metade da concentração dos sais (MS/2). Tem sido prática comum o uso de 2,4-D ou outra auxina sintética, isolada ou em combinação com uma citocinina (BAP, 2-iP ou cinetina (Cin)). As auxinas estão envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos. Em muitas espécies, o processo de iniciação se verifica ao se cultivar o explante em meio com concentração relativamente elevada de 2,4-D (GUERRA et al., 1999). Na embriogênese indireta, o calo crescendo em meio de cultura com concentrações relativamente altas de 2,4-D não produz embriões somáticos até a sua transferência para um meio de cultura com concentrações substancialmente menores ou com ausência de 2,4-D (SHARP et al., 1980).

Com respeito à iluminação, as necessidades variam conforme as plantas (MURASHIGE et al., 1979). Em geral, o processo de indução e iniciação de embriões somáticos é realizado no escuro, mesmo sabendo-se que a luz inibe o desenvolvimento dos embriões somáticos somente após a iniciação (GUERRA et al., 1999).

A seqüência básica da embriogênese somática consiste basicamente de dois ciclos: ciclo repetitivo e ciclo de maturação. O primeiro passo consiste em determinar na planta matriz a melhor fonte de explantes. No ciclo repetitivo um explante juvenil ou embrionário (por exemplo, um embrião zigótico) é inoculado em meio contendo 2,4-D. Essas culturas são mantidas no escuro e geram complexos ou massas celulares pró-embrionárias. Estas, por processo de embriogênese repetitiva, resultam em um ciclo repetitivo de divisões celulares, formando embriões somáticos globulares nas

angiospermas. No ciclo de maturação, esses pró-embriões são estimulados a se desenvolver pela retirada das auxinas do meio. Nesta etapa as culturas são mantidas em condições de luminosidade, formando embriões somáticos, que podem ser convertidos em plantas ou então encapsulados para a obtenção de sementes sintéticas (GUERRA et al., 1999).

As fases da embriogênese somática são, basicamente, as seguintes: 1) iniciação das culturas embriogênicas, 2) manutenção, multiplicação e cultura massal; 3) desenvolvimento e maturação. Segue-se a conversão dos embriões somáticos e a regeneração das plantas. Na fase de iniciação das culturas embriogênicas, em modelos diretos, ocorre o surgimento de estruturas globulares brancas e translúcidas, que correspondem a embriões somáticos globulares. Em modelos indiretos, há formação de calo e o surgimento neste de regiões friáveis, convencionalmente designados de massas ou complexos celulares pró-embriogênicos, os quais se dividem para formar pró-embriões somáticos. A segunda fase consiste no estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e controle dos processos de diferenciação, de maneira que as culturas sejam constituídas por células embrionárias ou embriões somáticos em estádios globulares. A fase de desenvolvimento e maturação consiste em estimular a progressão do desenvolvimento dos embriões somáticos, interrompendo os ciclos repetitivos e estimulando a diferenciação celular (GUERRA et al., 1999).

Várias espécies tropicais e subtropicais têm sido regeneradas através da embriogênese somática a partir de explantes retirados de árvores adultas. O potencial para embriogênese somática para algumas espécies perenes tropicais e subtropicais tem sido demonstrado em estudos tendo embriões zigóticos como explantes (LITZ e

JAISWAL, 1990). Entre as espécies de frutas tropicais e subtropicais que foram propagadas por embriogênese somática a partir de explantes retirados de árvores adultas, está a jacobinca (*Myrciaria cauliflora* – Myrtaceae). O explante utilizado foi o nucelo em meio de cultura MS com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D (LITZ, 1984).

LITZ e JAISWAL (1990) comentam que a aplicação da embriogênese somática na micropropagação de espécies frutíferas tropicais e subtropicais tem sido lenta e difícil devido à dificuldade em controlar uma embriogênese *in vitro* normal, atingindo altas taxas de conversão. A subcultura de pró-embriões de um meio de cultura contendo auxina para um meio de cultura sem auxina, é uma prática que favorece a diferenciação de órgãos do embrião. Entretanto, espécies de difícil propagação vegetativa provavelmente serão clonadas pela embriogênese somática, apesar do rejuvenescimento implícito nesta técnica limitar a sua aplicação como um método prático de micropropagação para várias espécies frutíferas perenes.

LITZ (1983) induziu a embriogênese somática a partir de óvulos de frutos imaturos de jacobinca em meio de cultura MS modificado contendo 2 mg.L^{-1} 2,4-D. A embriogênese somática ocorreu após subcultura em meio de cultura sem 2,4-D e os embriões somáticos maduros germinaram normalmente.

A embriogênese somática a partir de embriões zigóticos envolve, geralmente, a formação de calo, de onde se regeneram os embriões somáticos (MURASHIGE et al., 1979). Vários estudos têm sido feitos com o objetivo de pesquisar a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos. Trabalhando com a goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.), DAL VESCO (1998) utilizou embriões zigóticos extraídos de frutos imaturos e maduros para a indução de embriões somáticos. As maiores porcentagens de indução embriogenética foram observados em explantes

retirados de frutos maduros (80,8 %) e fisiologicamente maduros (78,8 %), coletados 135 e 120 dias após a antese. Para promover a conversão dos embriões somáticos, foram adicionados ao meio de cultura basal BAP (0 e 0,5 μM), Cin (0,5 μM), 2-isopenteniladenina (2-iP) (0,5 μM), em combinação com GA_3 (0 e 0,1 μM). Para melhorar a conversão dos embriões somáticos em plântulas completas, foram adicionados ao meio de cultura o BAP (0,25; 0,5 e 1,0 μM) e GA_3 (0,1 e 0,5 μM).

CANHOTO e CRUZ (1994) obtiveram indução e conversão de embriões somáticos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos de frutos de *Feijoa sellowiana* Berg. com várias alterações nos meios de cultura para as diversas fases. Em 1996, trabalhando com a mesma espécie, relatam que nunca obtiveram embriões somáticos a partir de embriões zigóticos na forma globular ou cordiforme e que o estágio de torpedo produz embriões somáticos em menores proporções que os embriões zigóticos maduros. Bons resultados foram obtidos a partir de embriões zigóticos maduros em meio de cultura MS com 1,0 mg.L^{-1} 2,4-D e 0,3 M de sacarose.

CRUZ et al. (1990) cultivaram embriões zigóticos de *Feijoa sellowiana* Berg. em meio de cultura MS com 0,5-5,0 mg.L^{-1} 2,4-D com ou sem cinetina (0,1-0,5 mg.L^{-1}). Concluíram que apenas 5 dias no meio de cultura de indução foram suficientes para induzir a embriogênese somática e que 14 dias foi o tempo ótimo. Acima deste tempo, aumentou muito o número de embriões somáticos com anormalidades, o que reduziu a sua capacidade de conversão. Estudos histológicos mostraram que ocorreu embriogênese somática direta, mas a indireta foi mais freqüente.

DAL VESCO (1998) observou que a permanência do embrião somático em meio de cultura com 2,4-D por mais de 13 semanas diminuiu a taxa de conversão e aumentou o número de embriões somáticos anormais, em goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). Verificou, também, que a conversão resultando em plântulas completas foi favorecida quando embriões somáticos na fase pré-cotiledonar foram inoculados em meios de cultura adicionados de BAP e GA₃. A transferência para meio de cultura sem fitorreguladores promoveu o desenvolvimento e alongamento epicótilo-radícula.

GUERRA et al. (1997) e DAL VESCO (1998) observaram respostas diferenciadas na indução e expressão da embriogênese somática em (*Feijoa sellowiana* Berg.), demonstrando ser genótipo dependente.

Embriões imaturos também foram utilizados como explantes para a indução de embriogênese somática em morango (WANG et al., 1984), banana (ESCALANT e TEISSON, 1989 ; CRONAUER e KRIKORIAN, 1988), abacate (PLIEGO e MURASHIGE, 1988) e mamão (FITCH e MANSARDT, 1990).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL

Os experimentos foram realizados entre novembro de 1995 e janeiro de 1998, no Laboratório de Micropropagação Vegetal e na casa de vegetação climatizada do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba - PR.

3.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ESTAQUIA

As estacas foram coletadas no Sítio São Marcos, em Campina Grande do Sul – PR, região metropolitana de Curitiba. Campina Grande do Sul está a 25°19' Sul e 49°51' Oeste, a 918 m de altitude (CRMC, 1984).

O experimento foi instalado em bandejas de isopor com tubetes plásticos. Foi aproveitada apenas metade da capacidade de cada bandeja, intercalando-se espaços vazios, evitando que as estacas tocassem umas nas outras.

Os experimentos de estaquia permaneceram em casa de vegetação com irrigação por nebulização com 2 min de nebulização a cada 30 min.

Os resultados foram submetidos a análise de variância. Todas as variáveis foram transformadas por $x^{1/2}$, por se tratarem de contagens. As variâncias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Bartlett quanto à homogeneidade. As variáveis cujas variâncias mostraram-se homogêneas tiveram as médias dos tratamentos testadas por meio do teste F, enquanto que as que apresentaram heterogeneidade tiveram os valores originais transformados para posterior análise. Quando os resultados revelaram existir diferenças entre as médias de tratamentos estatisticamente significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

3.2.1 Estaquia semi-lenhosa

As estacas utilizadas neste experimento foram retiradas de plantas de rebrota natural, com altura variando entre 0,3 e 1,5 m.

Os ramos foram acondicionados em sacos plásticos abertos e borrifados com água para evitar a desidratação, durante o período de coleta e transporte. Após a coleta o material foi levado para uma área coberta e acondicionado em baldes com água.

A partir dos ramos coletados, foram preparadas 1.680 estacas com as seguintes características: comprimento de 8 a 12 cm, mínimo de três nós por estaca, corte em bisel logo abaixo do nó inferior e logo acima do nó superior, gema apical descartada e um par de folhas inteiras. As estacas preparadas foram sempre mantidas em recipientes com água.

Foram testados 7 estimuladores em 2 tipos de substrato, resultando em 14 tratamentos. Foi utilizado o etanol e o AIB. Os tratamentos foram: 1) 100% água; 2) etanol 20%; 3) etanol 40%; 4) 50% etanol; 5) AIB 500 mg.L⁻¹; 6) AIB 1.000 mg.L⁻¹; e 7) AIB 2.000 mg.L⁻¹. Como substratos foram utilizados areia e uma mistura orgânica comercial (Plantmax[®]), sendo: A) 100% Plantmax[®]; B) 2/3 Plantmax[®] + 1/3 areia.

O etanol utilizado foi o comercial e a água foi deionizada. As soluções de AIB foram preparadas com 50% de etanol, para completa dissolução. O tempo de imersão das estacas nas soluções foi de 15 s, sendo imediatamente colocadas no substrato.

O experimento foi instalado no dia 13 de junho de 1997 e teve duração de 90 dias, quando foi feita a avaliação. Foram avaliados: a) número de estacas enraizadas; b) número de estacas com calo na base; c) número de estacas com gemas inchadas; d) número de estacas com brotações; e e) número de estacas vivas.

O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com 14 tratamentos, 4 repetições e 30 estacas por parcela, totalizando 1.680 estacas.

3.2.2 Estaquia herbácea

Para a estaquia herbácea, a fonte de explantes foram árvores adultas da mesma espécie (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.).

Foram coletados galhos com grande número de ramos do ano, os quais foram transportados para a área coberta junto à casa de vegetação, onde foram

acondicionados em baldes com água, onde permaneceram durante o preparo das estacas.

Foram preparadas 1.440 estacas de ramos jovens e verdes do ano, com as seguintes características: 8 a 12 cm de comprimento, mínimo de 3 nós, cortes em bisel logo abaixo do nó inferior e logo acima do nó superior, nó apical descartado e manutenção de um par de folhas inteiras.

Foram testados 6 estimuladores e 2 tempos de imersão, totalizando 12 tratamentos. Foi utilizado o AIB e o etanol. Os tratamentos utilizados foram: 1) Testemunha; 2) 100% água; 3) etanol 50%; 4) AIB 1.000 mg.L⁻¹; 5) AIB 5.000 mg.L⁻¹; e 6) AIB 10.000 mg.L⁻¹. Os tempos de imersão aplicados foram: A) 30 s; e B) 2 h.

Como substrato, foi utilizada uma mistura contendo 1/3 de areia peneirada e 2/3 de Plantmax®.

Foram utilizados água deionizada e etanol comercial no preparo das soluções. As soluções de AIB foram preparadas com 50% de etanol, para dissolução completa.

O experimento foi instalado no dia 21 de setembro de 1997 e teve duração de 120 dias, quando foi feita a avaliação. Foram avaliados: a) número de estacas enraizadas; b) número de estacas com retenção de folhas; e c) número de estacas vivas.

O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com 12 tratamentos, 4 repetições e 30 estacas por parcela, totalizando 1.440 estacas.

3.3 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO*

Foram utilizadas 3 técnicas de propagação *in vitro*: micro-estaquia, cultura de meristemas e embriogênese somática.

Na micro-estaquia foram utilizadas 3 fontes de explantes: plantas mantidas na casa de vegetação, uma árvore adulta a campo e plântulas assépticas oriundas de sementes germinadas *in vitro* (de uma única árvore adulta).

Para a cultura de meristemas foram utilizadas duas fontes de explantes: plantas mantidas na casa de vegetação e uma árvore adulta a campo.

A fonte de explantes para a embriogênese somática foram frutos em fase inicial de maturação, coletados de uma única árvore matriz a campo.

As plantas mantidas em casa de vegetação (100) tinham aproximadamente dois anos e meio de idade, procedentes do viveiro do Horto Florestal de Curitiba – PR, foram mantidas em sacos plásticos apropriados de 5 litros. Foram tratadas com pulverizações semanais com o fungicida Benomyl, na concentração de 1 g.L^{-1} . As plantas sofreram podas regulares para estimular as brotações novas.

As coletas de material a campo foram feitas no Sítio São Marcos, em Campina Grande do Sul - PR, região metropolitana de Curitiba.

As culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, com controle de fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura. O fotoperíodo foi de 16 h com luminosidade de $25 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a temperatura ambiente mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Os frascos com as culturas foram mantidos em prateleiras a 30 cm de distância das lâmpadas fluorescentes, do tipo luz do dia. As primeiras etapas da embriogênese

somática foram desenvolvidas em ambiente escuro, utilizando prateleiras sem iluminação, fechadas com plástico preto, na mesma sala.

Os agentes desinfestantes utilizados foram: etanol comercial a 70% e hipoclorito de sódio (NaOCl) comercial 10-12%. Nas soluções de hipoclorito de sódio foi adicionado o adesivo espalhante Tween 20, na concentração de 0,01%. A água utilizada para o preparo das soluções e nas lavagens foi deionizada e esterilizada em autoclave a 120°C por 40 min.

No texto, a solução comercial de hipoclorito de sódio 10-12% será referida apenas como NaOCl.

O meio de cultura básico utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) ou o MS/2 (MS com a concentração de sais reduzida pela metade) e o agente gelificante foi o ágar.

3.3.1 Micro-estaquia

3.3.1.1 Matrizes – plantas da casa de vegetação

Foram coletadas brotações novas, as quais foram colocadas num frasco com água deionizada durante o tempo de coleta. A coleta foi sempre realizada no dia seguinte à última pulverização com fungicida.

As brotações foram cortadas em segmentos nodais, dos quais foram cortadas as folhas, deixando-se até 0,5 cm do pecíolo. Os segmentos foram então lavados rapidamente numa solução de água com detergente comum e enxaguados. Em seguida passaram para os procedimentos de desinfestação próprios de cada teste.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados por 4 vezes em água deionizada e esterilizada, permanecendo nesta água durante o tempo de isolamento.

O meio de cultura utilizado em todos os testes foi o MS com a concentração de sais reduzida pela metade (MS/2) e solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar.

Foram realizados sete testes de desinfestação com os explantes retirados das plantas mantidas na casa de vegetação. No tratamento 3, o antibiótico foi adicionado ao meio de cultura ainda quente, após a autoclavagem.

Tratamentos de desinfestação				Tratamento no meio de cultura	Reguladores	Nº explantes/tratam.	Duração (dias)
Nº	Pré-tratamentos	Concentrações de NaOCl (%)	Tempos de imersão (min)				
1	–	10, 15, 20 e 25	5, 10 e 20	–	–	20	20
2	–	5, 10 e 20	20, 30 e 40	–	–	16	30
3	Lavagem rápida em água corrente com detergente; imersão em etanol 70% por 10 s	5	15	cloranfenicol: 0, 5, 10 e 20 mg.L ⁻¹	2 mg.L ⁻¹ BAP	30	20
4	Lavagem rápida em água corrente com detergente; lavagem em água corrente por 20 min; imersão em etanol 70% por 10 s	2,5, 5 e 10	5 e 10	–	–	20	20
5	Imersão em solução de Benomyl 0,5 % por 6 h; lavagem em água corrente por 1 h	5 e 10	10	–	–	16	30
6	Lavagem em água corrente por 4 h; imersão em etanol 70% por 15 s	10	10 e 20	–	–	20	30
7	Imersão em etanol 70 % por 2 min	10	10 e 30	–	–	20	30

Ao final de cada teste foram avaliados a porcentagem de explantes contaminados e não contaminados.

3.3.1.2 Matrizes – Árvores adultas a campo

A planta que serviu como fonte de explantes não sofreu qualquer tratamento antes da coleta dos ramos. Foram coletados ramos grandes inteiros. Estes foram levados ao laboratório, onde foram, então, retirados os segmentos nodais e ápices caulinares dos ramos jovens do ano. Foram retiradas as folhas, deixando-se até 0,5 cm do pecíolo. Durante o preparo os segmentos permaneceram imersos em água deionizada. Os segmentos foram, então, rapidamente lavados em uma solução de água com detergente e bem enxaguados. Em seguida passaram pelos procedimentos próprios de cada teste. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados 4 vezes em água deionizada e esterilizada, permanecendo nesta água durante o tempo de isolamento.

O meio de cultura utilizado foi o MS, com a concentração de sais reduzida pela metade e solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar.

Foram realizados 2 testes de desinfestação com os explantes coletados a campo.

Nº	Tratamentos de desinfestação			Tipos de explantes	Nº de explantes / tratamento	Duração (dias)
	Pré-tratamentos	Concentrações de NaOCl (%)	Tempos de imersão (min)			
1	Lavagem em água corrente por 20 min; imersão em etanol 70 % por 10 s	10 e 20	5 e 10	Segmento nodal e ápice caulinar	60	30
2	Lavagem em água corrente por 30 min e 24 h; imersão em etanol 70 % por 10 s	0, 5, 10 e 20	10	Segmento nodal	30	15

Ao final de cada teste foram avaliados a porcentagem de explantes contaminados e não contaminados.

3.3.1.3 Matrizes – plântulas assépticas

Foram coletados frutos maduros (coloração amarela) e semi-maduros (iniciando a coloração amarela), de três árvores adultas a campo. Os frutos que não foram aproveitados no mesmo dia da coleta foram acondicionados em envelopes duplos de papel pardo e colocados em refrigerador (4-6°C), por até uma semana.

As plântulas assépticas foram obtidas a partir das sementes retiradas dos frutos, desinfestadas e germinadas *in vitro*. Foram realizados diversos testes para encontrar o melhor método de germinação das sementes.

Nos testes 2 e 6 as sementes foram separadas manualmente da polpa, por meio de lavagens sucessivas sobre tela de sombrite e com areia peneirada. Foram selecionadas as sementes inteiras e aparentemente viáveis, as quais foram colocadas em um saquinho de gaze, para facilitar o processo de desinfestação.

Nos testes 3, 4 e 5 as sementes foram retiradas assepticamente, dentro da câmara de fluxo laminar, após desinfestação dos frutos inteiros. Os frutos foram lavados em água corrente com detergente e os pedúnculos e sépalas remanescentes retirados.

O teste 1 utiliza os dois métodos de desinfestação de frutos e sementes descritos acima.

O meio de cultura de isolamento nos testes 1, 2 e 3 foi o MS com a concentração de sais reduzida pela metade, solidificado com 6 g.L⁻¹ de ágar. Nos

testes 4 e 5 o meio de isolamento foi o MS, solidificado com 6 g.L^{-1} de ágar. O teste 6 utilizou o meio MS líquido, sobre base de algodão.

No teste 2, as sementes, separadas da polpa, foram colocadas para secar sobre papel absorvente, à sombra e em temperatura ambiente, por 2 dias.

As sementes colocadas na posição vertical, ficaram com a área da micrópila para dentro do meio de cultura.

Testes de desinfestação e germinação das sementes:

Nº	Tipo de explante desinfestado	Tratamentos de desinfestação			Posição da semente sobre o meio	Nº de sementes / tratamento	Duração (meses)
		Pré-tratamentos	Concentrações de NaOCl (%)	Tempos de imersão (min)			
1	1) frutos 2) sementes 3) sementes	1, 2 e 3) imersão em etanol 70% por 30 s	1) 30 2) 5 3) 10	1) 30 2) 15 3) 15	vertical	1, 2 e 3) 30	1
2	Sementes	–	10	10	horizontal	56	3
3	Frutos	–	10 e 20	30	vertical	60	2
4	Frutos	–	30	30	vertical	99	1
5	Frutos	Imersão em etanol 70% por 1 min	30	30	vertical	50	1
6	Sementes	Imersão em etanol 70% por 1 min	10	15	horizontal (meio líquido)	180	1

Ao final de cada teste foram avaliados: porcentagem de sementes não contaminadas (germinadas e não germinadas) e contaminadas.

Teste de multiplicação:

A partir das plântulas obtidas durante os testes de desinfestação e germinação, foram realizados os testes de multiplicação das micro-estacas.

Para este teste foram utilizadas as sementes germinadas e não contaminadas dos testes 1 e 6 de desinfestação e germinação. Estas sementes germinadas

passaram para um meio de cultura de desenvolvimento em frascos grandes, entre 34 e 40 dias após a germinação.

O meio de cultura utilizado nesta fase foi o MS líquido, com a concentração de sais reduzida à metade, sobre base de algodão, em frascos grandes.

Foram utilizadas 260 sementes germinadas. As plântulas permaneceram neste meio de cultura por 23 dias, período no qual elas se desenvolveram. Então as plântulas foram repicadas para o meio de cultura de multiplicação.

O meio de cultura utilizado no teste de multiplicação foi o MS, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, acrescido de BAP e AIB nos seguintes tratamentos: 1) Testemunha; 2) 0,5 mg.L⁻¹ BAP; 3) 2,0 mg.L⁻¹ BAP; 4) 0,5 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ AIB; e 5) 2,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ AIB.

Como explantes foram usados 225 segmentos nodais das plântulas assépticas, descartando-se o nó basal e o ápice, com comprimento variando entre 1,6 e 2,0 cm.

Foram isoladas 45 micro-estacas por tratamento, com 3 segmentos por frasco. Foram utilizados frascos médios e os segmentos foram colocados em posição vertical. O teste teve duração de 27 dias, quando foram avaliados: porcentagem de micro-estacas com raízes e com calo na base, e o número e comprimento médios das brotações por micro-estaca.

Teste de enraizamento:

As brotações obtidas no teste de multiplicação passaram para o teste de enraizamento. Foram aproveitadas apenas as brotações com mais de 0,5 cm.

Foi utilizado meio MS, com a concentração de sais reduzida pela metade e solidificado com 6 g.L^{-1} de ágar, com os seguintes tratamentos: 1) Testemunha; 2) 2 mg.L^{-1} AIB; e 3) 4 mg.L^{-1} AIB.

Foram utilizados frascos médios, 6 segmentos por frasco, totalizando 30 segmentos por tratamento. O teste teve duração de 40 dias, quando foram avaliados: porcentagem de micro-estacas com calo e sem calo (sem raiz e com raiz).

3.3.2 Cultura de meristemas

A coleta foi realizada sempre um dia após a aplicação do fungicida. Foram coletados ramos inteiros, dos quais foram retiradas as folhas, deixando-se até 0,5 cm de pecíolo. Estes ramos foram colocados em água deionizada durante a coleta. Os segmentos foram lavados rapidamente numa solução de água com detergente e enxaguados. Em seguida, passaram para os procedimentos de desinfestação próprios de cada teste.

Após a assepsia, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados por 4 vezes em água deionizada e esterilizada, permanecendo nesta água durante o tempo de isolamento.

Testes de desinfestação e sobrevivência:

Os meristemas foram isolados com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Para os isolamentos, foram utilizados tubos de ensaio.

O meio de cultura utilizado foi o MS, solidificado com 6 g.L^{-1} de ágar, possuindo a concentração de sais reduzida pela metade nos testes 4 e 5 e a concentração normal nos demais.

Nº	Tipo de meristema	Local de coleta	Tratamentos de desinfestação			Reguladores de crescimento no meio de cultura (mg.L^{-1})	Nº explantes / tratamento	Duração (dias)
			Pré tratamento	Concentrações de NaOCl (%)	Tempos de imersão (min)			
1	Axilares com 2 primórdios foliares	Plantas na casa de vegetação	--	5	5 e 10	1) 1 BAP + 0,5 AIB 2) 1 BAP + 0,1 AIB 3) 1 BAP 4) 0,5 BAP + 0,5 AIB 5) 0,5 BAP + 0,1 AIB 6) 0,5 BAP	12	30
2	Apicais de brotações novas	Árvore adulta a campo	Imersão em etanol 70% por 10 s	10	5 e 10	1 BAP + 0,5 AIB	41	12
3	Apicais de brotações novas	Plantas na casa de vegetação	Imersão em etanol 70% por 10 s	10	5, 10 e 20	1 BAP + 0,5 AIB	20	10
4	Axilares com 2 primórdios foliares	Plantas na casa de vegetação	--	10	5, 10, 20 e 40	--	20	30
5	Axilares com 4 primórdios foliares	Plantas na casa de vegetação	--	10	10, 20 e 40	--	20	30
6	Axilares com 4 primórdios foliares	Plantas na casa de vegetação	Imersão em etanol 70% por 10 s	10	10 e 20	1) 1 BAP + 0,1 AIB 2) 0,5 BAP + 0,1 AIB	20	15
7	Axilares com 2 primórdios foliares	Plantas na casa de vegetação	--	10	10 e 20	1) testemunha 2) 1 BAP + 0,5 AIB	14	10
8	Gemas laterais inchadas	Árvore adulta a campo	Imersão em etanol 70% por 10 s	40	15	--	40	10

Foram avaliados: porcentagem de explantes não contaminados e contaminados.

Testes de desenvolvimento e multiplicação:

O teste 1 foi desenvolvido a partir dos meristemas sobreviventes dos testes de desinfestação de 1, 4, 5 e 7. O teste 2 foi desenvolvido a partir dos meristemas sobreviventes do teste de desinfestação de número 2. O teste 3 foi desenvolvido a partir do teste 3 de desinfestação.

Após o isolamento os meristemas foram repicados duas vezes (1ª e 2ª fases).

Nº	1ª fase				2ª fase			
	Meio de cultura	Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Nº de meristemas	Duração (dias)	Meio de cultura	Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Nº de meristemas	Duração (dias)
1	MS	1) testemunha 2) 0,5 BAP	40	90	MS	0,80 AIB + 0,49 BAP + 0,40 GA ₃	20	30
2	MS / 2	0,5 BAP + 0,05 AIB	48	10	MS / 2	0,80 AIB + 0,49 BAP + 0,40 GA ₃	20	40
3	MS / 2	0,5 BAP + 0,05 AIB	40	12	MS	0,80 AIB + 0,49 BAP + 0,40 GA ₃	36	30

Ao final dos testes foi avaliada a sobrevivência dos meristemas.

3.3.3 Embriogênese somática

Os explantes utilizados para a embriogênese somática foram embriões zigóticos desenvolvidos inteiros.

A planta usada para coleta dos frutos foi uma única árvore adulta, produtora de frutos grandes e saborosos. Os frutos, em dois estádios de maturação (pré-maturação – frutos totalmente desenvolvidos mas verdes; ou iniciando a maturação – iniciando a coloração amarela), foram coletados e levados ao laboratório, onde foram selecionados os melhores e acondicionados em envelopes de papel pardo e conservados sob refrigeração (4-6 °C) por até 5 dias.

A assepsia foi realizada com os frutos inteiros. Foram lavados em água corrente com detergente, sendo enxaguados a seguir. Passaram, então, por imersão em solução de etanol 70%, por um minuto, passando, então, para uma solução de NaOCl a 30% onde permaneceram por 40 minutos, sob agitação intermitente. Então, os frutos foram enxaguados 4 vezes, com água deionizada estéril. Os frutos permaneceram imersos em água estéril durante a retirada dos embriões. Esta foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio (150 mm de comprimento por 17 mm de diâmetro).

3.3.3.1 Teste preliminar

Foram utilizados frutos em fase de pré-maturação (desenvolvidos mas ainda de coloração verde).

O meio de cultura foi solidificado com 4 g.L⁻¹ ágar e acrescido de 0,1; 1; 2 e 5 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinados com 0,1 mg.L⁻¹ de BAP. Foram comparadas duas condições de luminosidade: ambiente escuro e ambiente com pouca luminosidade.

Foram isolados 8 embriões zigóticos por tratamento. Os testes tiveram duração de 60 dias, quando foram avaliados: contaminação, desenvolvimento do epicótilo, presença de raiz e de calo.

3.3.3.2 Fases da embriogênese somática

1ª FASE: Indução dos embriões somáticos

O meio de cultura de isolamento foi o MS com a concentração de sais reduzida pela metade, com 7 g.L⁻¹ de ágar e acrescido de 2,4-D (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg.L⁻¹) combinado com BAP (0; 0,05 e 0,1 mg.L⁻¹).

Foram testados 15 tratamentos, com 12 explantes por tratamento.

Os explantes permaneceram neste meio de cultura, em ambiente escuro dentro da sala de crescimento, por 90 dias. Aos 80 dias foram avaliados o número de explantes com: calo preto, calo branco ou amarelado, calo marrom escuro, calo marrom claro, embriões zigóticos germinados, embrião zigótico com epicótilo desenvolvido, ausência de calo e formação de embrião somático.

Nesta fase foram denominados calos todas as formações de massas celulares não diferenciadas.

2^a FASE: 1^a Repicagem das massas celulares e calos, para expressão dos embriões somáticos

Aos 90 dias, as massas celulares, calos e segmentos do embrião zigótico de todos os tratamentos, foram transferidos para o meio de cultura MS solidificado com 3,5 g.L⁻¹ de ágar e acrescido de 2,4-D e Cin nos seguintes tratamentos: 1) Testemunha; 2) 0,25 mg.L⁻¹ 2,4-D; 3) 0,50 mg.L⁻¹ 2,4-D; 4) 1,00 mg.L⁻¹ 2,4-D; 5) 0,25 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,10 mg.L⁻¹ Cin; 6) 0,50 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,10 mg.L⁻¹ Cin; 7) 1,00 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,10 mg.L⁻¹ Cin; 8) 0,25 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,20 mg.L⁻¹ Cin; 9) 0,50 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,20 mg.L⁻¹ Cin; e 10) 1,00 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,20 mg.L⁻¹ Cin.

As massas celulares e calos foram transferidos aleatoriamente para estes meios de cultura. Os explantes que não apresentaram evolução alguma, contaminaram e os que morreram foram descartados.

Todos os tubos receberam uma numeração, identificando cada embrião. Este número acompanhou o embrião e suas repicagens durante todo o experimento.

Após 110 dias nesta fase foram identificadas as seqüências de meios de cultura que apresentaram formação de embriões somáticos.

Esta etapa teve duração de 135 dias, em ambiente escuro.

3ª FASE: Manutenção e multiplicação de embriões somáticos

Aos 225 dias as massas celulares embriogênicas e as conjuntos de embriões somáticos já formados (nos estádios globular, cordiforme e torpedo), foram transferidos, aleatoriamente, para meio de cultura MS solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar e acrescido de 2,4-D e Cin, nos seguintes tratamentos: 1) Testemunha; 2) $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D; 3) $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D + $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ Cin; 4) $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D + $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$ Cin.

Esta fase teve duração de 90 dias, em ambiente escuro. Após 80 dias nesta fase foram identificadas as seqüências de meios de cultura que apresentaram melhor evolução.

4ª FASE: Desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos

Aos 315 dias, aglomerados de embriões somáticos e embriões somáticos isolados foram transferidos para meio MS solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar contendo a seguinte combinação de reguladores de crescimento: 1) Testemunha; 2) $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ Cin + $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA; e 3) $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ 2i-P + $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA.

Parte dos tubos, contendo os aglomerados com embriões somáticos nos primeiros estádios de desenvolvimento, permaneceram em ambiente escuro. A outra

parte, contendo os embriões somáticos isolados em estágio cotiledonar ou convertidos, passaram para ambiente com luz.

5ª FASE: Conversão dos embriões somáticos e formação das plântulas

Aos 351 dias, os embriões somáticos no estágio cotiledonar ou convertidos em plântulas foram transferidos para meio de cultura MS solidificado com 5 g.L^{-1} de ágar, sem reguladores de crescimento, na ausência ou presença (1 g.L^{-1}) de carvão ativado. Esta fase foi desenvolvida em ambiente com luz.

Após 30 dias as plântulas formadas foram transferidas para meio de cultura MS líquido, com a concentração de sais e de sacarose reduzida pela metade, acrescido dos seguintes reguladores de crescimento: $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ 2i-P e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB. Este meio de cultura foi colocado em tubos de ensaio com fundo de algodão. Os tubos foram mantidos em ambiente com luz.

Após 20 dias neste meio de cultura, as plântulas formadas foram transferidas para a casa de vegetação para aclimatização. Como substrato foi utilizado o Plantmax® autoclavado por 40 min a 120°C . As plântulas foram regadas duas vezes ao dia durante a primeira semana e depois apenas uma vez ao dia.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ESTAQUIA

4.1.1 Estaquia semi-lenhosa

Foram avaliados o número de estacas com formação de calo na base, o número de estacas com gemas inchadas, o número de estacas com brotações e o número de estacas vivas. Verificou-se que nenhum tratamento foi suficiente para promover o enraizamento neste tipo de estaca.

Os resultados da análise de variância dos dados das variáveis avaliadas e os valores de qui-quadrado (χ^2) referentes ao teste de Bartlett encontram-se no Anexo 1. Verifica-se que somente o número de estacas com calo na base apresentou diferenças estatisticamente significativas na análise de variância para a interação dos efeitos substrato x regulador.

As porcentagens médias do número de estacas com calo na base são apresentadas na Tabela 1.

Alguns aspectos da estaquia semi-lenhosa de guabirobeira podem ser observados na Figura 1.

TABELA 1. PORCENTAGEM DE ESTACAS COM CALO NA BASE QUANDO SUBMETIDA AOS 2 SUBSTRATOS E AOS 7 TRATAMENTOS PARA A ESTAQUIA SEMI-LENHOSA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.).

Tratamentos	Estacas com calo	
	100 % Plantmax [®]	2/3 Plantmax [®] + 1/3 areia
Água 100%	10,00 a	9,16 b
Etanol 20%	5,83 a	21,66 ab
Etanol 40%	6,66 a	16,66 ab
Etanol 50%	5,00 a	7,50 b
AIB 500 mg.L ⁻¹	5,83 a	26,66 a
AIB 1.000 mg.L ⁻¹	9,16 a	14,16 ab
AIB 2.000 mg.L ⁻¹	5,83 a	7,50 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos tratamentos para o substrato 100% Plantmax[®]. No substrato com 2/3 Plantmax[®] + 1/3 areia, as médias dos tratamentos com etanol 20%, etanol 40%, AIB 500 mg.L⁻¹ e AIB 1.000 mg.L⁻¹ foram estatisticamente iguais. O tratamento com AIB 500 mg.L⁻¹ apresentou maior número de estacas com formação de calo na base, diferindo significativamente dos demais tratamentos.

Observa-se que, apesar das altas concentrações de AIB, não ocorreu enraizamento. A única resposta positiva aos tratamentos foi a formação de calo na base das estacas (Figura 1-C), notadamente no tratamento com 500 mg.L⁻¹ de AIB. Embora a formação de calo não indique obrigatoriamente que poderia haver formação de raízes, este resultado estimula um melhor estudo da estaquia semi-lenhosa, pois, para algumas espécies de difícil enraizamento, a formação de raízes se dá sobre o calo (FACHINELLO et al., 1995). Observa-se, porém, que houve formação de calo em todos os tratamentos, inclusive no tratamento só com água, não dependendo necessariamente, da aplicação de etanol ou AIB.

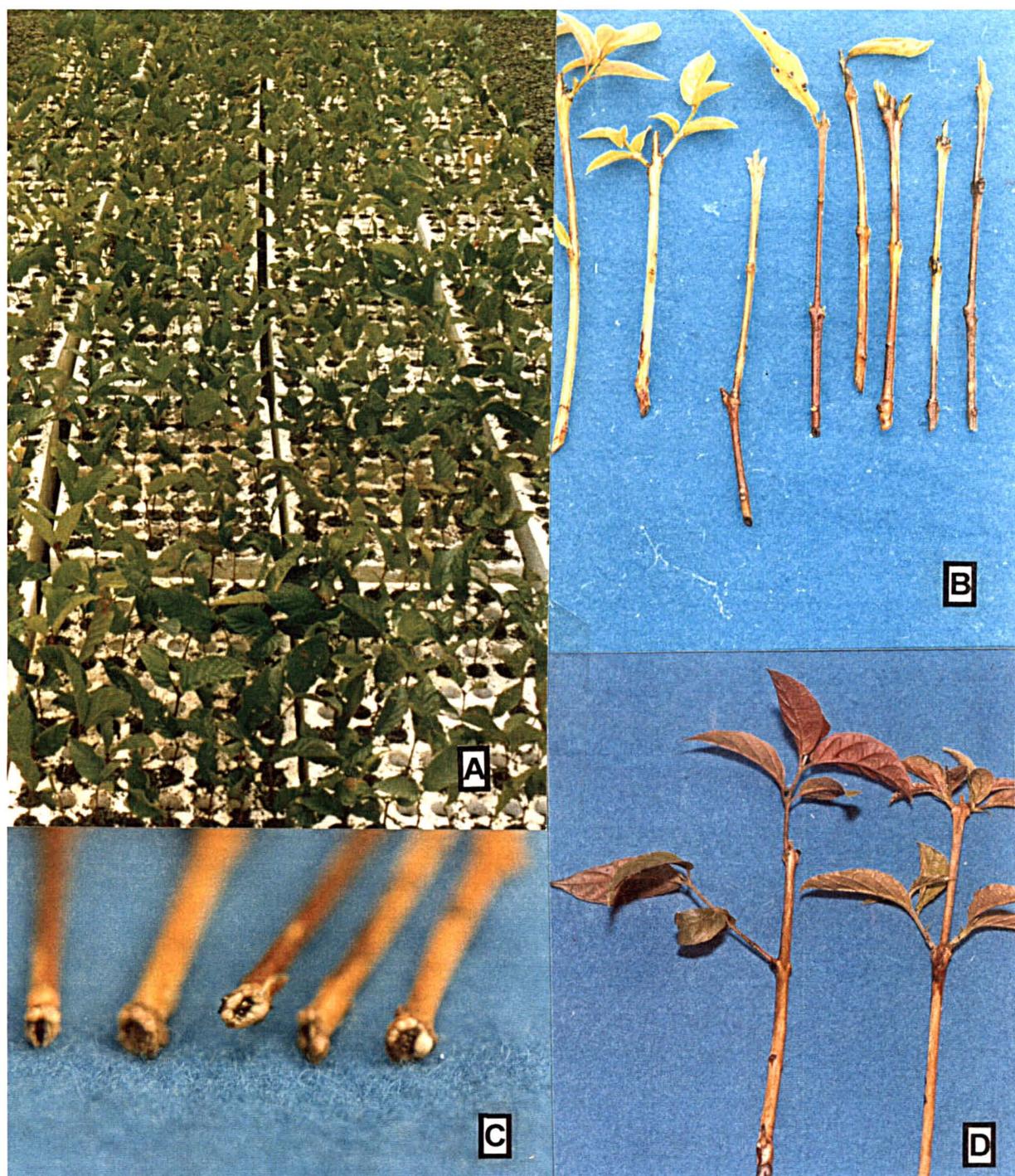


FIGURA 1. ASPECTOS DA ESTAQUIA SEMI-LENHOSA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.): A- EXPERIMENTO INSTALADO NA CASA DE VEGETAÇÃO; B- CARACTERÍSTICAS DAS ESTACAS AO FINAL DO EXPERIMENTO: COM BROTAÇÕES, COM GEMAS INCHADAS, COM FOLHAS VELHAS, BROTAÇÕES MORRENDO, E ESTACAS MORTAS; C- DETALHE DOS CALOS FORMADOS NA BASE DE ALGUMAS ESTACAS; D- ASPECTO DAS BROTAÇÕES AO FINAL DO EXPERIMENTO.

Muitas estacas brotaram, indicando que havia reservas de nutrientes (Figuras 1B e 1D). Ao final do experimento, entretanto, algumas brotações começaram a morrer, provavelmente pelo esgotamento das reservas falta de raízes para absorver novos nutrientes.

4.1.2 Estaquia herbácea

Foram avaliados o número de estacas com retenção de folhas e o número de estacas vivas.

Os tratamentos aplicados neste experimento não resultaram em enraizamento das estacas herbáceas de guabirobeira.

No Anexo 2 são apresentados os resultados da análise de variância dos dados das variáveis avaliadas e os valores de qui-quadrado (χ^2) referentes ao teste de Bartlett. Verifica-se que para o número de estacas vivas, a interação dos fatores não foi estatisticamente significativa, indicando que seus efeitos são independentes. Os fatores tempo e tratamentos apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) e foram analisados separadamente. O número de estacas com retenção de folhas não pôde ser analisada, porque a variância foi significativa. Isto ocorre pelo fato de várias médias terem valor igual a zero.

Na Tabela 2 pode-se observar as porcentagens das estacas que permaneceram vivas, onde as estacas sem tratamento e os tratamentos com AIB 5.000 mg.L⁻¹ e AIB 10.000 mg.L⁻¹ não diferiram entre si; no entanto, foram significativamente superiores aos demais tratamentos.

TABELA 2. PORCENTAGEM DE ESTACAS VIVAS QUANDO SUBMETIDA AOS 6 TRATAMENTOS, PARA A ESTAQUIA HERBÁCEA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.).

Tratamentos	% de estacas vivas
Testemunha	36,23 a
Água 100%	15,40 b
Etanol 50%	9,16 b
AIB 1.000 mg.L ⁻¹	6,23 b
AIB 5.000 mg.L ⁻¹	42,50 a
AIB 10.000 mg.L ⁻¹	44,56 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se, na Tabela 2, que a testemunha e os tratamentos com 5.000 e 10.000 mg.L⁻¹ de AIB apresentaram o maior número de estacas vivas ao final do experimento. Entretanto, estas não apresentaram formação de calo, raízes ou brotação das estacas.

Embora HARTMANN et al. (1997) sugiram que estacas herbáceas de espécies de difícil enraizamento respondam bem ao tratamento com auxina e enraizem mais facilmente, a guabirobeira teve reação oposta, nas condições dos dois experimentos. Embora não tenha havido formação de raízes em nenhum dos dois casos, houve formação de calo e brotação das estacas semi-lenhosas.

É possível que algum outro tratamento nas estacas resulte em enraizamento, conforme observaram FIGUEIREDO et al. (1995) com a *Feijoa sellowiana* Berg., onde o estiolamento das estacas aumentou a formação de raízes, enquanto que o AIB, em todas as concentrações, reduziu o enraizamento.

4.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO*

4.2.1 Micro-estaquia

4.2.1.1 Matrizes – plantas da casa de vegetação

Todos os testes realizados resultaram em alta contaminação, principalmente por bactérias. Os resultados dos Testes 1 e 2 mostram a expressiva contaminação bacteriana (Tabelas 3 e 4). A contaminação fúngica foi sempre inferior ou, no máximo, igual à bacteriana.

TABELA 3. EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 1).

Tratamentos*	Contaminadas (%)		Não contaminadas (%)	
	Fungos	Bactérias	Vivas	Mortas
NaOCl 10% - 5 min.	0	90	0	10
NaOCl 10% - 10 min.	0	90	0	0
NaOCl 10% - 20 min.	20	90	5	15
NaOCl 15% - 5 min.	10	100	0	0
NaOCl 15% - 10 min.	0	80	10	10
NaOCl 15% - 20 min.	0	70	10	20
NaOCl 20% - 5 min.	10	70	5	20
NaOCl 20% - 10 min.	0	90	0	10
NaOCl 20% - 20 min.	0	100	0	0
NaOCl 25% - 5 min.	10	80	5	5
NaOCl 25% - 10 min.	0	90	0	10
NaOCl 25% - 20 min.	0	80	10	10

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

Não foi observada tendência de melhores resultados em relação a alguma concentração de desinfestante ou tempo de imersão utilizados. A porcentagem máxima de explantes não contaminados e vivos foi 12,5%, no Teste 2 (Tabela 4).

TABELA 4. EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 2).

Tratamentos*	Contaminadas (%)		Não contaminadas (%)	
	Fungos	Bactérias	Vivas	Mortas
NaOCl 5% - 20 min.	62,5	62,5	0	0
NaOCl 5% - 30 min.	62,5	62,5	12,5	0
NaOCl 5% - 40 min.	37,5	75,0	0	0
NaOCl 10% - 20 min.	50,0	87,5	0	0
NaOCl 10% - 30 min.	37,5	62,5	12,5	0
NaOCl 10% - 40 min.	12,5	87,5	0	0
NaOCl 20% - 20 min.	25,0	62,5	12,5	0
NaOCl 20% - 30 min.	25,0	87,5	0	0
NaOCl 20% - 40 min.	25,0	100,0	0	0

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

Os resultados dos Testes 4 a 7 são apresentados no Anexo 4. No Teste 4 todos os explantes estavam contaminados ao final do experimento, provavelmente em função das baixas concentrações e tempos empregados.

Alguns Testes (1, 2 e 5) apresentaram explantes não contaminados e vivos no momento da avaliação, porém, não é possível relacionar certos tratamentos com os melhores resultados. Estes resultados discrepantes podem ser atribuídos ao pequeno número de explantes utilizado nos Testes. Além disto, observou-se que, após 12 dias, todos os explantes sobreviventes também apresentaram contaminação bacteriana. Isto indica que todos os tratamentos foram ineficientes e que alguns explantes apenas levaram mais tempo para expressar a contaminação. Fato também observado por BARROS e PASQUAL (1991) trabalhando com o cultivo *in vitro* de café, onde a utilização de NaOCl não exerceu efeito na redução da contaminação bacteriana.

A contaminação apresentou sinais de ser interna, pois muitos explantes apresentaram a formação de um halo ao seu redor. No caso de microorganismos endofíticos, estes escapam dos efeitos dos desinfestantes de superfície (CASSELLS, 1990). Os resultados indicam que a desinfestação externa não controlou a contaminação bacteriana. A contaminação bacteriana endógena é comum em plantas lenhosas, conforme também verificou BIASI (1993) com o cultivo *in vitro* de abacateiro. Neste caso, a micropropagação foi viabilizada pela adição de antibiótico no meio de cultura.

Tendo em vista a total contaminação bacteriana, em todos os testes realizados, procedeu-se a investigação do tipo de bactéria mais freqüente. Foi observado que dois tipos de colônias predominavam: uma branca e outra amarela. Frascos com explantes apresentando esta contaminação foram levados ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, para identificação, conforme laudo em anexo (Anexo 3). Foram identificadas duas espécies de *Erwinia sp.*

TABELA 5. EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTIBIÓTICO CLORANFENICOL NO MEIO DE CULTURA PARA CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 3).

Tratamentos*	Contaminadas (%)		Não contaminadas (%)
	Fungos	Bactérias	
Testemunha	33,33	100	0
Cloranfenicol 5 mg.L ⁻¹	33,33	100	0
Cloranfenicol 10 mg.L ⁻¹	40,00	100	0
Cloranfenicol 20 mg.L ⁻¹	33,33	100	0

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

O antibiótico utilizado no meio de cultura para tentar controlar a contaminação não foi eficaz nas doses utilizadas no Teste 3 (Tabela 5) . A contaminação por bactérias foi de 100%. Talvez as doses utilizadas tenham sido baixas para controlar a contaminação bacteriana. No controle da bactéria *Acinetobacter anitratum*, responsável pela contaminação endógena de explantes de abacateiro, BIASI (1993) obteve inibição do crescimento de colônias com doses superiores a 50 mg.L⁻¹. A utilização de concentrações elevadas de cloranfenicol pode causar efeitos fitotóxicos, conforme observado por POLLOCK et al. (1983) para *Nicotiana plumbaginifolia*, PHILLIPS et al. (1981) para *Helianthus tuberosus*, OKKELS e PEDERSEN (1988) para beterraba e cenoura e BIASI (1993) para o abacateiro. A utilização de antibióticos não teve desenvolvimento porque, além de dificultar e encarecer o processo, a ação destes pode ser biostática e não biocida, mascarando os resultados, conforme colocação de CASSELLS (1990).

4.2.1.2 Matrizes – árvores adultas a campo

Este método resultou em maior contaminação fúngica em relação aos testes com explantes retirados de plantas na casa de vegetação. A planta matriz é a maior fonte de contaminação na micropropagação e deve ser cuidadosamente selecionada, evitando-se as altamente contaminadas (CASSELLS, 1990). Entretanto, a planta matriz a campo não sofreu qualquer tipo de tratamento e apresentava, visualmente, alta contaminação fúngica.

TABELA 6. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) (APÓS LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE POR 20 min E 10 s DE IMERSÃO EM ETANOL A 70%) NA DESINFESTAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES E SEGMENTOS NODAIS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADOS DE PLANTAS ADULTAS A CAMPO (TESTE 1).

Tratamentos*			Contaminadas (%)		Não contaminadas (%)
Explante	Desinfestação		Fungos	Bactérias	
Ápice caulinar	NaOCl 10%	5 min	100	56,66	0
Ápice caulinar	NaOCl 10%	10 min	100	90	0
Ápice caulinar	NaOCl 20%	5 min	90	53,33	0
Ápice caulinar	NaOCl 20%	10 min	96,66	63,33	0
Segmento nodal	NaOCl 10%	5 min	100	100	0
Segmento nodal	NaOCl 10%	10 min	100	90	0
Segmento nodal	NaOCl 20%	5 min	100	56,66	0
Segmento nodal	NaOCl 20%	10 min	100	90	0

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

A contaminação fúngica foi superior à bacteriana em todos os tratamentos do Teste 1 (Tabela 6), no dia da avaliação. Porém, após 7 dias todos os explantes também apresentaram sintomas de contaminação bacteriana.

No Teste 2 (Tabela 7) os resultados para contaminação fúngica e bacteriana foram semelhantes em todos os tratamentos. Porém, da mesma forma que o Teste 1, após 5 dias, todos os explantes apresentaram contaminação bacteriana.

Observa-se que nos testes realizados com micro-estacas retiradas de plantas em casa de vegetação (tratadas com fungicida) e de árvores adultas a campo, os métodos de desinfestação utilizados não controlaram a contaminação. Isto indica que a contaminação neste tipo de explante de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) é de difícil controle e a micropropagação utilizando este tipo de explante deve ser melhor estudada.

TABELA 7. EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE (SEGUIDA DE IMERSÃO RÁPIDA EM ETANOL A 70%) E IMERSÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCI) POR 10 min NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE PLANTAS ADULTAS A CAMPO (TESTE 2).

Tratamentos*		Contaminadas (%)		Não contaminadas (%)	
		Fungo	Bactéria	Viva	Morta
Lavagem 30 min	Testemunha	100	100	0	0
Lavagem 30 min	NaOCI 5%	96,66	100	0	0
Lavagem 30 min	NaOCI 10%	93,33	96,66	0	3,33
Lavagem 30 min	NaOCI 20%	93,33	93,33	3,33	3,33
Lavagem 24 h	Testemunha	100	100	0	0
Lavagem 24 h	NaOCI 5%	90	100	0	0
Lavagem 24 h	NaOCI 10%	100	100	0	0
Lavagem 24 h	NaOCI 20%	90	100	0	0

* NaOCI refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

4.2.1.3 Matrizes - plântulas assépticas

Testes de desinfestação e germinação:

Como não foram obtidos resultados satisfatórios com a micro-estaquia com explantes de plantas na casa de vegetação e de árvores adultas a campo, foi testada a viabilidade da utilização de plântulas assépticas como fonte de explantes de micro-estacas. Neste caso os explantes foram obtidos com a germinação de sementes *in vitro*. As sementes foram uma opção por estarem livres de contaminação fúngica, pois os fungos externos não atingem o interior dos frutos. As bactérias endógenas também não parecem atingir as sementes. LITZ e JAISWAL (1990), observaram que a contaminação microbiana não tem sido um grande problema em explantes nucelares ou ovulares, pois o nucelo não tem conexão com o tecido materno, sendo suficiente, geralmente, a desinfestação de frutos e flores.

Porém, a limitação do uso de sementes como fonte de explantes é a variação genética decorrente da polinização aberta. Isto resulta na reprodução de plantas de genótipo desconhecido, ao contrário da clonagem de uma planta adulta de características conhecidas e desejadas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A germinação iniciou entre 6 e 12 dias após o isolamento, em todos os testes.

Para testar a desinfestação e a germinação das sementes, foram feitas várias tentativas. Na primeira, com as sementes separadas dos frutos (Teste 2 – Anexo 5) a contaminação não foi o fator limitante, mas sim a baixa germinação das sementes (3,57%). Isto provavelmente ocorreu porque as sementes foram colocadas sobre o meio de cultura, na posição horizontal. Isto impediu um bom contato da mesma com o meio de cultura, dificultando a germinação.

Além disto, a dificuldade em separar as sementes da polpa dos frutos foi grande. Por isto, foi testada também a assepsia dos frutos inteiros, com as sementes retiradas assepticamente (Testes 3, 4 e 5 – Anexo 5). A posição em que as sementes foram colocadas sobre o meio de cultura (com a região da micrópila para dentro do meio de cultura) (Figura 2A) aumentou a porcentagem de sementes germinadas (até 40%).

A contaminação foi alta nos Testes 3, 4 e 5 (Anexo 5). Nos dois primeiros, isto provavelmente ocorreu pela falta do tratamento com etanol 70%.

O Teste 6 apresentou a menor contaminação (1,66%) e 96,11% de sementes germinadas vivas (Anexo 5). O meio de cultura de isolamento deste Teste foi diferente (líquido, em base de algodão) e apesar da posição horizontal das sementes sobre o meio de cultura, estas germinaram bem, pois o contato com o meio de cultura foi bom.

O Teste 1 compara a desinfestação de frutos inteiros e de sementes separadas da polpa (Tabela 8).

TABELA 8. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) (APÓS IMERSÃO EM ETANOL A 70% POR 30 s) SOBRE A DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES E FRUTOS (DOS QUAIS FORAM ISOLADAS AS SEMENTES) DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) (TESTE 1).

Tratamentos*		Contaminadas (%)	Não contaminadas (%)	
Explante	Desinfestação		Germinadas	Não germinadas
Frutos	NaOCl 30% - 30 min.	3,33	96,66	0
Sementes	NaOCl 5% - 15 min.	3,33	96,66	0
Sementes	NaOCl 10% - 15 min.	6,66	93,33	0

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

A porcentagem de sementes contaminadas foi baixa em ambos os casos (até 6,66%), não indicando haver diferenças entre estas duas formas de assepsia. A germinação das sementes foi alta nos três tratamentos (93,33 a 96,66%).

Esta técnica teve prosseguimento com os testes de multiplicação e enraizamento.

Teste de multiplicação:

É possível induzir a multiplicação das micro-estacas com e sem reguladores de crescimento. Sem a presença de BAP o número médio de brotações por estaca foi baixo (1,4), porém, o comprimento médio das brotações (0,71 cm) foi mais que o dobro do comprimento das brotações do melhor tratamento com BAP (2 mg.L⁻¹ BAP, com 0,34 cm). O pior resultado foi do tratamento com a maior concentração de BAP (2 mg.L⁻¹), acrescentado de AIB (0,1 mg.L⁻¹) (Tabela 9). O aspecto das

brotações pode ser observado nas Figuras 2-E e 2-F. Resultado semelhante foi obtido por MOHAMED YASSEEN et al. (1995), com goiaba, onde o meio de cultura com AIB apresentou o maior índice de enraizamento, mas os brotos foram menores do que os obtidos no meio de cultura com carvão ativado.

TABELA 9. EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE BAP E AIB SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.).

Tratamentos	Presença de raízes (%)	Presença de calo na base (%)	Nº médio de brotações por estaca	Comprimento médio das brotações (cm)
Testemunha	9,52	2,38	1,40	0,71
0,5 mg.L ⁻¹ BAP	0	0	3,13	0,31
2,0 mg.L ⁻¹ BAP	2,22	0	2,13	0,34
0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	0	30,95	2,90	0,33
2,0 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	0	0	2,00	0,20

Teste de enraizamento:

No teste de enraizamento o único tratamento em que houve formação de raiz foi a testemunha (sem reguladores de crescimento), onde também não houve formação de calo. A presença do AIB no meio de cultura promoveu intensa formação de calo na base das estacas (até 60%) (Tabela 10).

Provavelmente as concentrações de AIB no meio de cultura foram altas, promovendo a formação de calo, em detrimento da formação de raízes, conforme explicam GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998). As Figuras 2-C e 2-D mostram a formação de calo e raiz.

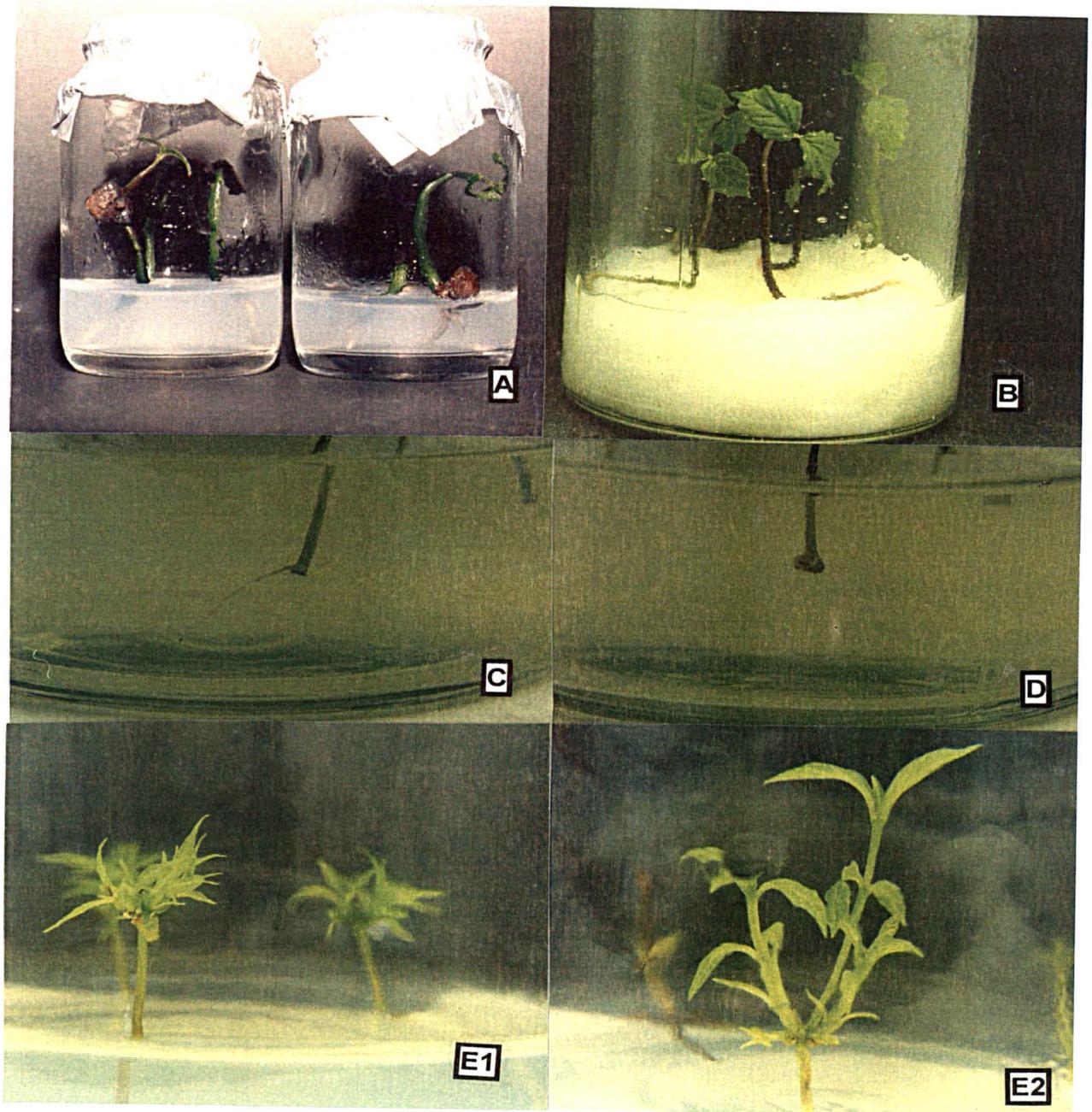


FIGURA 2. ASPECTOS DA MICRO-ESTAQUIA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) A PARTIR DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS: A- GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO* APÓS 28 DIAS EM MEIO DE CULTURA MS ACRESCIDO DE 6 g.L^{-1} DE ÁGAR; B- DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS GERMINADAS *IN VITRO* EM MEIO MS LÍQUIDO EM BASE DE ALGODÃO, 45 DIAS APÓS A GERMINAÇÃO; C- DETALHE DE MICRO-ESTACA COM RAIZ EM MEIO MS/2 SEM REGULADOR; D- DETALHE DE MICRO-ESTACA COM CALO NA BASE EM MEIO MS/2 COM 2 mg.L^{-1} AIB; E- ASPECTOS DA MULTIPLICAÇÃO EM MEIO MS COM 7 g.L^{-1} DE ÁGAR: 1- COM 2 mg.L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB ; 2- SEM REGULADORES.

TABELA 10. EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE AIB SOBRE O ENRAIZAMENTO DE MICRO-ESTACAS DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.).

Tratamentos	Estacas com calo (%)	Estacas sem calo (%)	
		Sem raiz	Com raiz
Testemunha	0	80	20
2 mg.L ⁻¹ AIB	60	40	0
4 mg.L ⁻¹ AIB	50	50	0

É possível o uso desta técnica para a propagação da guabirobeira, porém é necessário estudar melhor a fase de enraizamento das micro-estacas para, então, levar as plântulas para a aclimatização.

4.2.2 Cultura de Meristemas

Testes de desinfestação e sobrevivência:

Em todos os testes nota-se uma elevada contaminação bacteriana, mesmo naqueles em que o meristema foi retirado com apenas dois primórdios foliares (Testes 1, 4 e 7) (Tabela 11 e Anexo 6) ou nos meristemas apicais jovens (Testes 2 e 3) (Tabelas 12 e 13). A contaminação fúngica não foi expressiva nem limitante na maioria dos tratamentos. Nota-se que a contaminação por fungos foi alta (50%) apenas no Teste 8 (Anexo 6), onde os meristemas foram retirados de gemas inchadas de material de campo, com alta contaminação, apesar da alta concentração de NaOCl (40%) a que foi exposto. Neste caso, a planta matriz estava altamente contaminada, o que deve ser evitado. Porém, dependendo do tamanho do meristema isolado, a maioria dos microorganismos deveriam ser eliminados (CASSELLS,1990).

TABELA 11. EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 5% E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP E AIB NO MEIO DE ISOLAMENTO NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS AXILARES DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) ISOLADOS COM 2 PRIMÓRDIOS FOLIARES DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 1).

Tratamentos*		Explantos não contaminados (%)		Contaminação (%)	
Desinfestação	Reguladores de crescimento	vivos	mortos	fungos	bactérias
NaOCl 5% - 5 min	1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ AIB	0	16,66	16,66	66,66
NaOCl 5% - 5 min	1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	0	33,33	25	58,33
NaOCl 5% - 5 min	1 mg.L ⁻¹ BAP	16,66	16,66	0	33,33
NaOCl 5% - 5 min	0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ AIB	50	8,33	0	41,66
NaOCl 5% - 5 min	0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	33,33	8,33	0	58,33
NaOCl 5% - 5 min	0,5 mg.L ⁻¹ BAP	16,66	41,66	0	41,66
NaOCl 5% - 10 min	1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ AIB	8,33	25	0	66,66
NaOCl 5% - 10 min	1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	33,33	8,33	8,33	50
NaOCl 5% - 10 min	1 mg.L ⁻¹ BAP	33,33	8,33	0	58,33
NaOCl 5% - 10 min	0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ AIB	16,66	8,33	0	75
NaOCl 5% - 10 min	0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	41,66	0	0	58,33
NaOCl 5% - 10 min	0,5 mg.L ⁻¹ BAP	25	25	8,33	41,66

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

O número sempre expressivo de meristemas não contaminados e mortos nos testes pode ter a influência de dois fatores: a) a ação dos desinfestantes sobre estruturas tão delicadas e b) falhas no isolamento dos meristemas, pelo tamanho reduzido e dificuldade na visualização, mesmo com a ajuda do microscópio. Segundo HARTMANN et al. (1997), a dificuldade de estabelecimento de culturas de meristemas aumenta pela necessidade de manter o mínimo de primórdios foliares, diminuindo o tamanho do explante, para evitar a contaminação bacteriana interna.

Nos Testes 4 e 5 observa-se um aumento do número de meristemas não contaminados, porém mortos, com o aumento do tempo de exposição ao desinfestante, embora a contaminação bacteriana tenha diminuído (Anexo 6).

Na tentativa de aumentar o número de meristemas sobreviventes, após serem observados sinais de clorose e morte de alguns meristemas após algumas semanas do isolamento, foram feitos testes com meios de cultura acrescidos de reguladores de crescimento (Testes 1 e 6) (Tabela 11 e Anexo 6). No Teste 7 (Anexo 6) foi testada a adição de reguladores de crescimento, porém o BAP e o AIB não melhoraram a sobrevivência dos meristemas na fase de isolamento. RIBAS (1991), isolou, com sucesso, meristemas de macieira em meio de cultura MS contendo 1 mg.L⁻¹ BAP, 0,5 mg.L⁻¹ AIB e 0,1 mg.L⁻¹ GA₃.

Nos Testes 2 e 3 (Tabelas 12 e 13), onde foram utilizados meristemas apicais de brotações jovens, verificou-se boa sobrevivência dos meristemas (até 85%). A contaminação fúngica foi nula em ambos os testes e a contaminação bacteriana não foi total.

TABELA 12. EFEITO DA IMERSÃO EM ETANOL 70% POR 10 s SEGUIDA DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 10% NO ISOLAMENTO EM MEIO COM 1,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ AIB NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS APICAIS DE BROTAÇÕES JOVENS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE ÁRVORES ADULTAS A CAMPO (TESTE 2).

Tratamentos*	Explantos não contaminados (%)		Contaminação (%)	
	Vivos	Mortos	Fungos	bactérias
NaOCl 10% - 5 min	48,78	9,75	0	41,46
NaOCl 10% - 10 min	70,73	2,44	0	26,83

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TABELA 13. EFEITO DA IMERSÃO EM ETANOL 70% POR 10 s SEGUIDA DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 10% NO ISOLAMENTO EM MEIO COM 1,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ AIB NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS APICAIS DE BROTAÇÕES JOVENS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO (TESTE 3).

Tratamentos*	Explantos não contaminados (%)		Contaminação (%)	
	Vivos	Mortos	Fungos	bactérias
NaOCl 10% - 5 min	55	25	0	20
NaOCl 10% - 10 min	70	0	0	30
NaOCl 10% - 20 min	85	10	0	5

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

Testes de desenvolvimento e multiplicação:

O desenvolvimento dos meristemas nas etapas seguintes não foi satisfatório. Muitos apresentaram sintomas de contaminação bacteriana, provavelmente latente da fase de isolamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). As tabelas com os resultados dos Testes 1, 2 e 3 estão no Anexo 7.

No Teste 1 observa-se grande número de meristemas contaminados (18,18%) na 1ª fase (Testemunha e 0,5 mg.L⁻¹ BAP). O tratamento com 0,5 mg.L⁻¹ BAP apresentou 2 meristemas totalmente cobertos por calo (desenvolvimento anormal) e a testemunha apresentou 2 meristemas mortos. No tratamento sem reguladores de crescimento, o comprimento médio dos meristemas foi 5 vezes maior que no tratamento com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. Na figura 3-D pode-se observar um meristema em desenvolvimento em meio de cultura sem reguladores de crescimento. Na segunda fase, após 30 dias, todos os meristemas morreram. O aspecto geral indicava clorose, queda de folhas e folhas finas e longas.

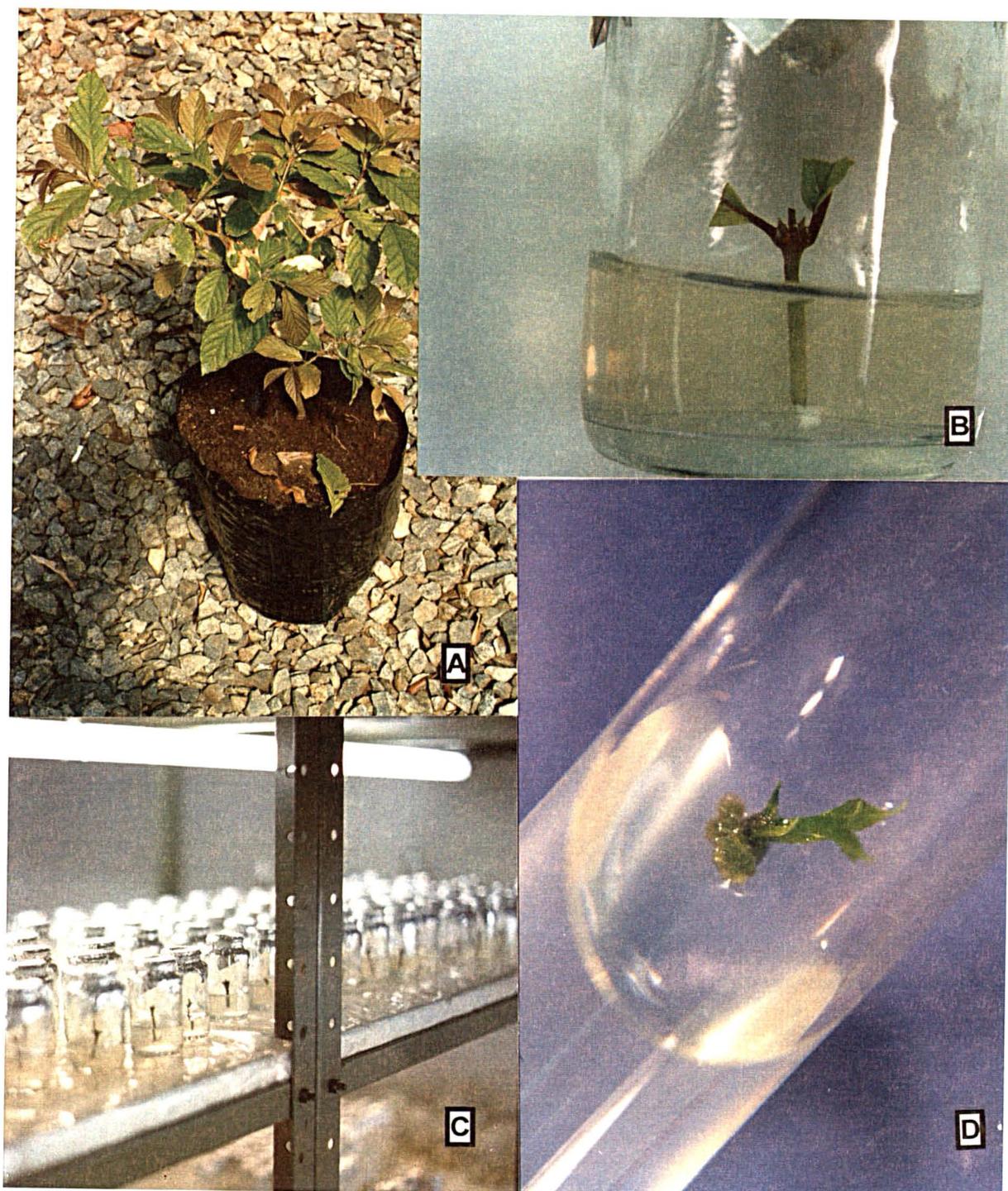


FIGURA 3. ASPECTOS DA CULTURA DE MERISTEMAS E MICRO-ESTAQUIA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) A PARTIR DE PLANTAS EM CASA DE VEGETAÇÃO: A- MUDA EM CASA DE VEGETAÇÃO, COM BROTAÇÕES NOVAS APÓS A PRIMEIRA PODA; B- FRASCO COM MICRO-ESTAQUIA APÓS O ISOLAMENTO; C- EXPERIMENTO DE MICRO-ESTAQUIA INSTALADO NA SALA DE CRESCIMENTO; D- TUBO DE ENSAIO COM MERISTEMA EM DESENVOLVIMENTO EM MEIO DE CULTURA SEM REGULADORES DE CRESCIMENTO.

No Teste 2 também pode-se observar grande quantidade de meristemas mortos na 1ª fase (0,5 mg.L⁻¹ BAP + 0,05 mg.L⁻¹ AIB). Na segunda fase, após 40 dias, todos morreram. O aspecto geral foi de clorose, queda de folhas e folhas finas e longas.

No Teste 3 verifica-se o menor número de meristemas mortos e contaminados na 1ª fase do desenvolvimento (0,5 mg.L⁻¹ BAP + 0,05 mg.L⁻¹ AIB). Na segunda fase, após 30 dias, todos morreram. O aspecto geral foi de clorose e queda de folhas.

São necessários novos testes com diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento para estabelecer e desenvolver os meristemas, pois os resultados demonstraram que é possível eliminar a contaminação bacteriana interna.

4.2.3 Embriogênese somática

4.2.3.1 Testes preliminares

Observa-se que no meio de cultura com a menor concentração de 2,4-D (0,1 mg.L⁻¹) houve formação de calo em menor número de explantes (12,5%) e maior porcentagem de embriões zigóticos com epicótilo desenvolvido (87,5%). Isto pode indicar que esta concentração seja baixa para a indução de massas celulares embriogênicas. REYNOLDS e MURASHIGE (1979), comentam que geralmente são usadas concentrações entre 1 e 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D para a indução da embriogênese somática. Nos tratamentos com 1 a 5 mg.L⁻¹ houve formação de calo sobre maior porcentagem dos embriões zigóticos isolados. Nos explantes mantidos no escuro,

esta variou de 50 a 75%, e nos explantes mantidos em ambiente com pouca luz variou de 25 a 50% (Anexo 8). Em modelos indiretos de embriogênese somática, há formação de calo e o surgimento neste de regiões friáveis, convencionalmente designados de massas ou complexos celulares pró-embriogênicos, os quais se dividem para formar pró-embriões somáticos (GUERRA et al., 1999). Portanto, a formação de calo ou massa celular é desejável na fase de indução da embriogênese. Observa-se, também que a formação de calo foi o dobro nos explantes mantidos no escuro, em relação aos mesmos tratamentos mantidos em ambiente com pouca luz, para as concentrações de 0,1, 1 e 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Apenas na concentração de 5 mg.L⁻¹ de 2,4-D a frequência foi igual (50%). Portanto, a ausência de luz favoreceu a formação de calo. Apesar de, aparentemente, não ter ocorrido a formação de embriões somáticos, a presença de calo é o primeiro passo para a embriogênese somática indireta e a ausência de luz favoreceu esta condição. Além disto, GUERRA et al. (1999) relatam que a indução e iniciação dos embriões somáticos geralmente ocorre no escuro.

4.2.3.2 Fases da embriogênese somática

1ª FASE:

Como foi observado para a guabirobeira, o meio de cultura (MS/2 acrescido de 2,4-D isolado ou em combinação com uma citocinina) foi adequado para induzir a formação de embriões somáticos sobre embriões zigóticos, ocorrendo a formação de calo e embriões somáticos. Isto está de acordo com as citações de CRUZ et al. (1990) e CANHOTO e CRUZ (1994) para embriogênese somática em Mirtáceas

frutíferas. Meios de cultura com alta concentração salina, como o MS, têm sido usados pelos efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento de embriões somáticos (GUERRA et al., 1999).

Entre 40 e 50 dias no meio de cultura de isolamento, observou-se a presença de embriões somáticos em estágio globular no tratamento 3 (1 mg.L^{-1} 2,4-D) em 16,67% dos explantes. No tratamento 2 ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D) e 8 (1 mg.L^{-1} 2,4-D + $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP) foram observados em 8,33% dos explantes, entre 50 e 60 dias (Tabela 14). Estes embriões somáticos no estágio globular apresentavam coloração branca leitosa e formaram-se a partir da massa celular desenvolvida sobre os embriões zigóticos, mostrando um modelo indireto de embriogênese somática (Figura 4-B). Houve formação de calo em todos os tratamentos. Segundo MURASHIGE et al. (1979), a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos geralmente envolve a formação de calo.

As principais observações feitas nesta fase podem ser observadas na Tabela 14.

O tratamento 1 ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) foi o único onde ocorreu o desenvolvimento do embrião zigótico isolado (33,33%). Na Figura 4-A pode-se observar o desenvolvimento do epicótilo do embrião zigótico, que ocorreu com maior frequência nos tratamentos 1 e 2 ($0,25$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D).

Ao final de 90 dias foi observado degeneração total dos embriões somáticos formados anteriormente, não ocorrendo seu desenvolvimento. Provavelmente, o tempo de permanência dos explantes no meio de indução foi muito longo. Esta observação está de acordo com GUERRA et al. (1999), que afirma que as condições que favorecem a indução da embriogênese somática, geralmente inibem o

TABELA 14. EFEITO DA COMBINAÇÃO DE BAP E 2,4-D NA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) APÓS 80 DIAS.

Tratamentos*	Calo preto (%)	Calo branco ou amarelado (%)	Calo marrom escuro (%)	Calo marrom claro (%)	Embrião zigótico com epicótilo desenvolvido (%)	Presença de embriões somáticos (%)
1	58,33	-	-	16,67	50	-
2	50	8,33	25	16,67	75	8,33
3	33,33	8,33	25	25	25	16,67
4	33,33	-	16,67	25	-	-
5	50	16,67	-	16,67	8,33	-
6	33,33	-	16,67	41,67	16,67	-
7	25	-	25	50	8,33	-
8	33,33	8,33	25	16,67	25	8,33
9	33,33	-	25	33,33	33,33	-
10	25	8,33	16,67	33,33	16,67	-
11	41,67	-	33,33	16,67	41,67	-
12	33,33	16,67	25	8,33	-	-
13	33,33	-	8,33	25	-	-
14	16,67	-	33,33	41,67	8,33	-
15	8,33	16,67	16,67	41,67	8,33	-

* Tratamentos: 1) 0,25 mg.L⁻¹ 2,4-D; 2) 0,50 mg.L⁻¹ 2,4-D; 3) 1 mg.L⁻¹ 2,4-D; 4) 2 mg.L⁻¹ 2,4-D; 5) 4 mg.L⁻¹ 2,4-D; 6) 0,25 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,05 mg.L⁻¹ BAP; 7) 0,50 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,05 mg.L⁻¹ BAP; 8) 1 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,05 mg.L⁻¹ BAP; 9) 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,05 mg.L⁻¹ BAP; 10) 4 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,05 mg.L⁻¹ BAP; 11) 0,25 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L⁻¹ BAP; 12) 0,50 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L⁻¹ BAP; 13) 1 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L⁻¹ BAP; 14) 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L⁻¹ BAP; 15) 4 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L⁻¹ BAP.

* Dados obtidos de 12 explantes por tratamento.

desenvolvimento dos embriões somáticos. CRUZ et al. (1990), concluíram que 14 dias foi o tempo ótimo para induzir a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *Feijoa sellowiana* Berg.. Entretanto, apesar das condições do meio de cultura não serem ideais, ocorreu a formação de embriões somáticos na faixa de 0,5 a 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

A utilização de embriões zigóticos maduros, isolados em meio de cultura MS com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, também foi o melhor resultado encontrado por CANHOTO e CRUZ (1994) para a embriogênese somática em *Feijoa sellowiana* Berg.. DAL VESCO (1998) também encontrou maiores porcentagens de indução embriogenética

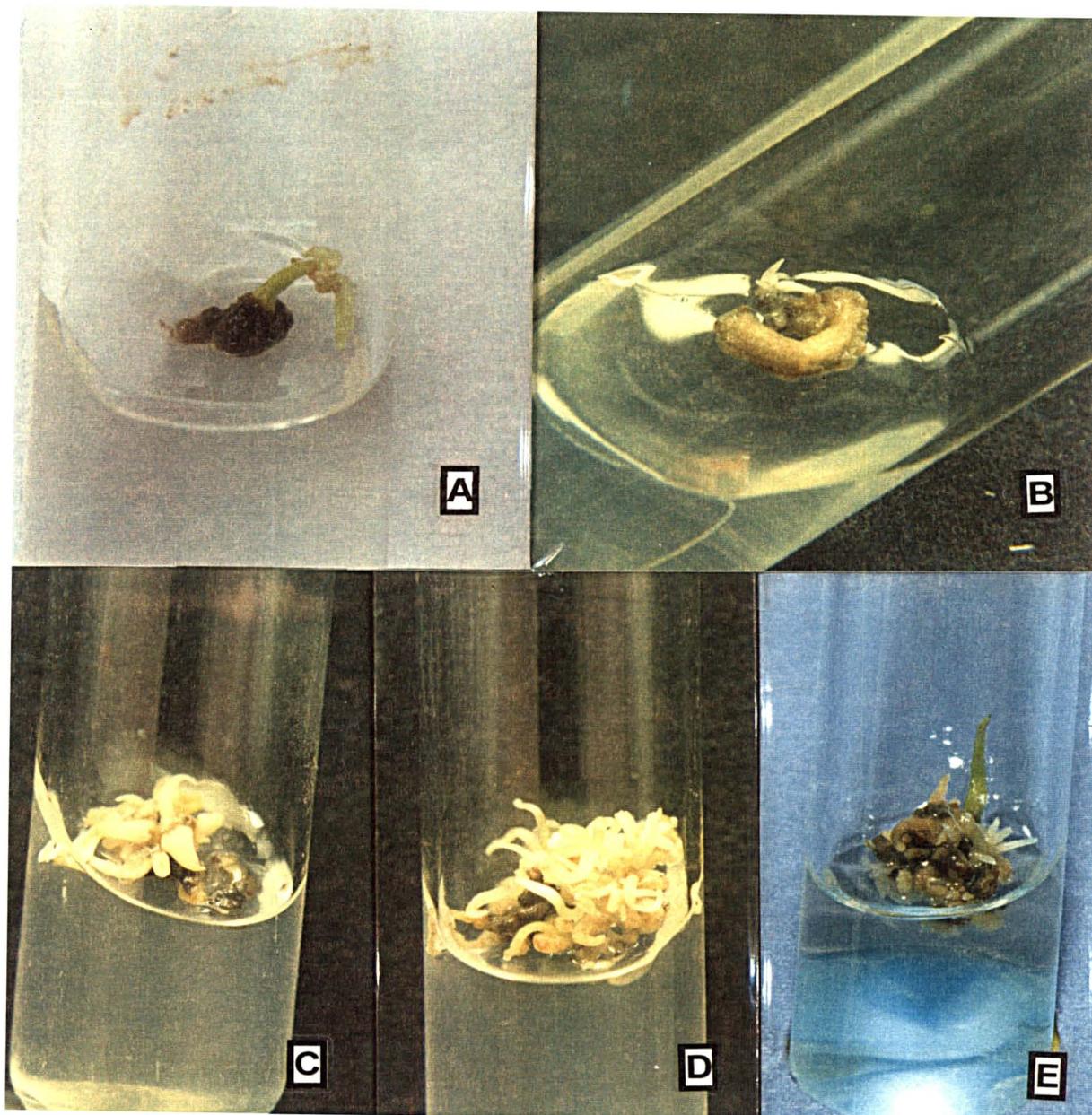


FIGURA 4. ASPECTOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS: A- EMBRIÃO ZIGÓTICO ISOLADO COM INÍCIO DE DESENVOLVIMENTO DO EPICÓTILO E FORMAÇÃO DE CALO (1ª FASE); B- CALO FORMADO SOBRE EMBRIÃO ZIGÓTICO, SOBRE O QUAL HÁ FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM MEIO SEM REGULADORES DE CRESCIMENTO (2ª FASE); C E D- ASPECTOS DA INTENSA FORMAÇÃO (DIRETA E INDIRETA) DE EMBRIÕES SOMÁTICOS, EM VÁRIOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EM MEIO SEM REGULADORES DE CRESCIMENTO (3ª FASE); E- MASSA CELULAR COM EMBRIÕES SOMÁTICOS SENESCENTES, SOBRE OS QUAIS OCORRE FORMAÇÃO (DIRETA) DE EMBRIÕES, EM MEIO SEM REGULADORES DE CRESCIMENTO (4ª FASE – AMBIENTE ESCURO).

em embriões zigóticos retirados de frutos maduros e fisiologicamente maduros. O fato de apenas alguns explantes (embriões zigóticos) terem expressado potencial embriogenético pode ser devido a diferença de genótipos, como observado por GUERRA et al. (1997) e DAL VESCO (1998) em *Feijoa sellowiana* Berg.

2ª FASE:

Após 30 dias neste meio, foram observados calos friáveis, claros e escuros, em diferentes meios de cultura (Testemunha, 0,25 mg.L⁻¹ 2,4-D e 0,5 mg.L⁻¹ 2,4-D). Formaram-se embriões somáticos sobre massas celulares (Figura 4-B), diretamente sobre tecidos do embrião zigótico e sobre embriões somáticos que não se desenvolveram na fase anterior. Também foram observados calos duros e gelatinosos.

Após 110 dias, observou-se a formação de embriões somáticos nos meios de cultura contendo entre 0 e 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e nos meios com 0,25 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D acrescido de 0,2 mg.L⁻¹ de Cin..

Na Tabela 15 podem ser observadas as seqüências de meios de cultura (da 1ª e 2ª fases) em que foram observados embriões somáticos, aos 200 dias.

Houve formação de embriões somáticos nos meios de cultura com 0, 0,25, 0,5 e 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e nos meios de cultura com 0,25 e 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D acrescido de 0,2 mg.L⁻¹ de Cin. As maiores freqüências foram observadas no meio sem reguladores e no meio com 0,25 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Segundo SHARP et al. (1980), na embriogênese indireta, o calo em meio de cultura com concentrações relativamente altas de 2,4-D não produz embriões somáticos até a sua transferência

TABELA 15. PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E SEQÜÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA NA 1ª E 2ª FASE DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS, 200 DIAS APÓS O ISOLAMENTO.

Clone	Tratamento 1ª Fase	Tratamento 2ª Fase	Presença de embriões somáticos (%)
102	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D	Testemunha	20
102	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D	0,50 mg.L ⁻¹ 2,4-D	16,66
102	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D	12,5
202	0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,20 mg.L ⁻¹ Cin	8,33
206	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,05 mg.L ⁻¹ BAP	0,50 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,20 mg.L ⁻¹ Cin	8,33
215	0,50 mg.L ⁻¹ 2,4-D	0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	22,22

para um meio de cultura com concentrações menores ou com ausência de 2,4-D.

A segunda fase, conforme definição de GUERRA et al. (1999), consiste no estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e controle dos processos de diferenciação. Entretanto, a segunda fase neste experimento objetivou a expressão dos embriões somáticos que foram induzidos na fase anterior, com a diminuição das concentrações de 2,4-D, ou na sua ausência.

Nota-se que apenas 4 clones resultaram em formação de embriões somáticos nesta fase. É possível que a indução e expressão da embriogênese somática seja genótipo dependente, conforme observaram GUERRA et al. (1997) e DAL VESCO (1998).

3ª FASE :

Constatou-se a presença de embriogênese somática direta e indireta. Ao final desta fase observou-se a presença de embriões somáticos em estágio globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 4-A e 4-B). Também foram observados embriões somáticos em conversão.

Os materiais com a melhor evolução ao final desta fase foram os seguintes, conforme as características observadas:

- Massa celular embriogênica friável com formação de vários embriões somáticos, em estádios iniciais de desenvolvimento:

Clone	Tratamento 1 ^a Fase	Tratamento 2 ^a Fase	Tratamento 3 ^a Fase
102	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D	0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D
206	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,05 mg.L ⁻¹ BAP	0,50 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,20 mg.L ⁻¹ Cin	Testemunha

- Massa celular embriogênica com vários embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento:

Clone	Tratamento 1 ^a Fase	Tratamento 2 ^a Fase	Tratamento 3 ^a Fase
102	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D	Testemunha	Testemunha
202	0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,20 mg.L ⁻¹ Cin	Testemunha

- Massa celular embriogênica com embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento e formação de novos embriões somáticos sobre embriões somáticos mais velhos:

Clone	Tratamento 1 ^a Fase	Tratamento 2 ^a Fase	Tratamento 3 ^a Fase
102	1,00 mg.L ⁻¹ 2,4-D	0,50 mg.L ⁻¹ 2,4-D	Testemunha
215	0,50 mg.L ⁻¹ 2,4-D	0,25 mg.L ⁻¹ 2,4-D	Testemunha

Nesta fase ocorreu a multiplicação (direta e indiretamente) e desenvolvimento de embriões somáticos, não seguindo a divisão citada por GUERRA et al. (1999), na qual a 3^a fase é de desenvolvimento e maturação. Verificou-se a instalação de um ciclo repetitivo de embriogênese somática. Dois tratamentos proporcionaram resultados expressivamente superiores aos demais: Testemunha e 0,25 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Comparando-se visualmente, o tratamento sem reguladores de crescimento (Testemunha) propiciou melhor multiplicação de embriões somáticos.

4ª FASE :

Nos tubos que permaneceram em ambiente escuro, verificou-se a contínua formação de novos embriões somáticos, porém, estes não se convertiam em plântulas (Figura 4-E). Nos tubos mantidos em ambiente com luz, alguns embriões somáticos apresentaram completo desenvolvimento e conversão. Observou-se também a presença de embriões e plântulas anormais (Figura 5-A).

TABELA 16. RESULTADOS OBTIDOS NA FASE DE DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES SOMÁTICOS (4ª FASE) DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS, 340 DIAS APÓS O ISOLAMENTO.

Tratamento		Observações
Escuro	Testemunha	Formação de novos embriões somáticos de forma direta em 30% dos tubos
Escuro	0,5 mg.L ⁻¹ Cin + 0,05 mg.L ⁻¹ ANA	Formação direta e indireta de novos embriões somáticos em 50% dos tubos
Escuro	1 mg.L ⁻¹ 2-iP + 0,05 mg.L ⁻¹ ANA	Superprodução de embriões somáticos em 10% dos tubos
Luz	Testemunha	Maior número de plântulas normais (visualmente), porém a parte aérea se desenvolveu melhor. Não houve indução de novos embriões somáticos
Luz	0,5 mg.L ⁻¹ Cin + 0,05 mg.L ⁻¹ ANA	Muitas plântulas anormais ou morrendo; indução direta de novos embriões somáticos, sobre os anteriores, em 60% dos tubos
Luz	1 mg.L ⁻¹ 2-iP + 0,05 mg.L ⁻¹ ANA	Plântulas normais e anormais, com melhor desenvolvimento de raízes

Observou-se que o material mantido em ambiente escuro manteve o ciclo repetitivo, não ocorrendo o desenvolvimento de plântulas. Os embriões somáticos, em estágio cotiledonar ou convertidos, que passaram para o ambiente com luz, converteram-se e desenvolveram plântulas. Houve produção de novos embriões somáticos apenas no tratamento com 0,5 mg.L⁻¹ Cin + 0,05 mg.L⁻¹ ANA.

Conforme GUERRA et al. (1999), o ciclo repetitivo consiste na manutenção de culturas constituídas por células embrionárias ou embriões somáticos em estágio globular, o que não ocorreu neste experimento, pois os embriões somáticos atingiam o estágio cotiledonar. Provavelmente, as concentrações ou combinações de reguladores de crescimento não foram adequados para a manutenção do ciclo repetitivo clássico. Nota-se que a ausência de luz não impediu a diferenciação celular do embrião somático, mas não favoreceu o desenvolvimento da plântula, embora tenham sido encontrados embriões somáticos convertidos no ambiente escuro. Portanto a luz favoreceu a conversão e permitiu o desenvolvimento das plântulas.

5ª FASE :

Muitos embriões somáticos convertidos formaram plântulas normais, mas também houve formação de plântulas com ausência de raízes e anormais, em ambos os meios de cultura (com ou sem carvão ativado) (Figura 5-B e 5-C). Não houve diferenças visuais entre os dois tratamentos. Após 20 dias, algumas plântulas apresentaram sinais de senescência: hastes e folhas tomaram coloração marrom e folhas começaram a cair, levando à morte. As plântulas normais e anormais que sobreviveram, continuaram a se desenvolver (Figura 5-D e 5-E).

Conforme LITZ e JAISWAL (1990), há dificuldade em controlar uma embriogênese somática normal *in vitro*. Porém, acreditam que seja este o caminho a seguir para a clonagem de espécies de difícil propagação vegetativa. Porém, o grande número de plântulas anormais pode ser devido ao longo tempo de permanência dos explantes e massas celulares em meio de cultura contendo 2,4-D.

DAL VESCO (1998) observou que a permanência do embrião somático em meio de cultura com 2,4-D por mais de 13 semanas diminuiu a taxa de conversão e aumentou o número de embriões somáticos anormais em *Feijoa sellowiana* Berg. Observou também que a transferência para meio de cultura sem fitorregulador promoveu o desenvolvimento e alongamento epicótilo-radícula.

Na Figura 5-F pode-se observar a seqüência do desenvolvimento dos embriões somáticos, passando pelos estádios cordiforme, torpedo e cotiledonar, até a plântula formada.

Foram transplantadas 10 plântulas para a casa de vegetação (Figura 5-G). 9 plântulas apresentaram sintomas de desidratação alguns dias após o transplante. Uma plântula sobreviveu e seguiu seu desenvolvimento.

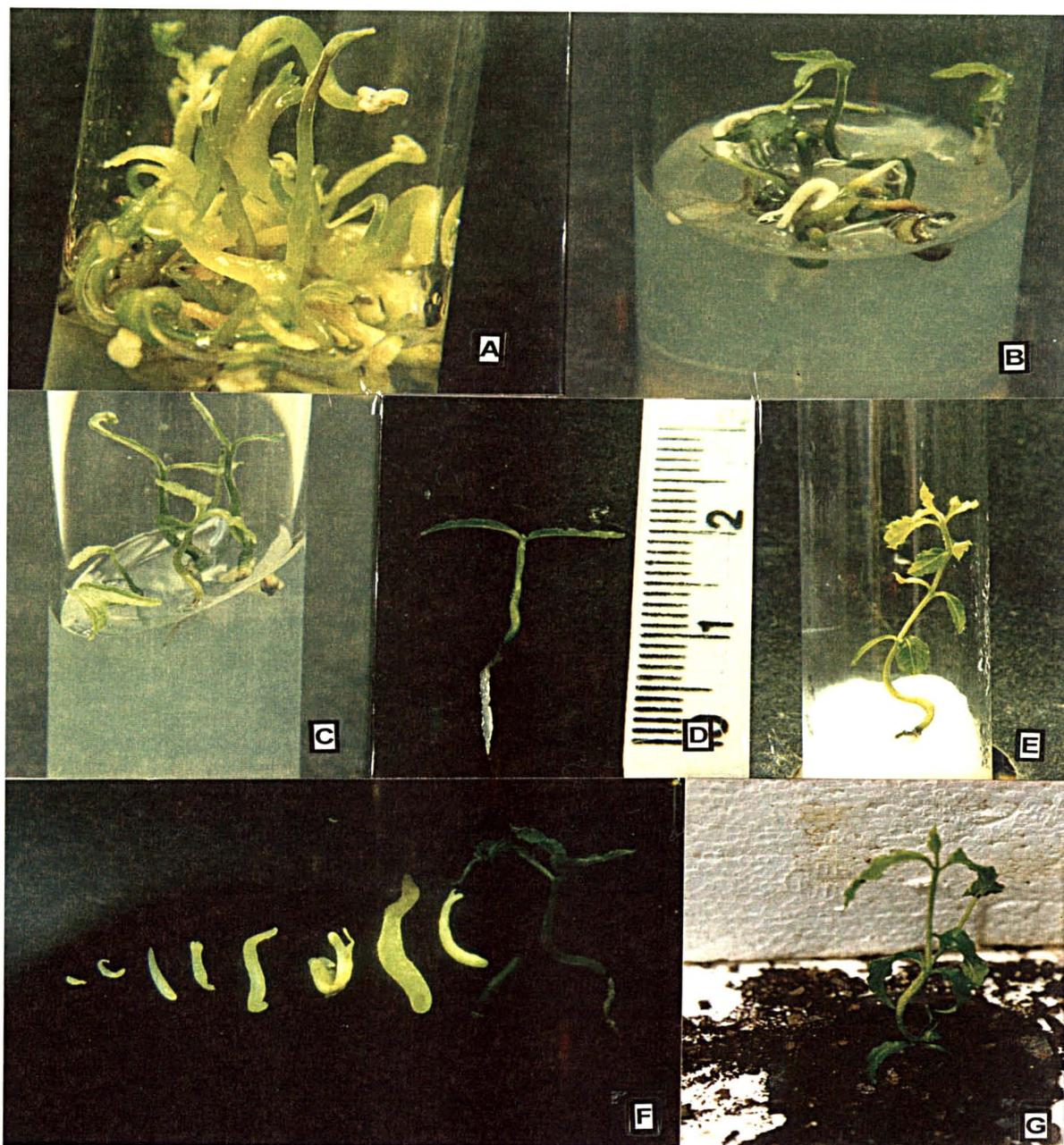


FIGURA 5. ASPECTOS DA FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS A PARTIR DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.): A- INTENSA FORMAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS SOBRE EMBRIÕES SOMÁTICOS MAIS VELHOS, EM AMBIENTE COM LUZ EM MEIO COM $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ CIN + $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA (4ª FASE); B- CONVERSÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS, COM FORMAÇÃO DIRETA DE NOVOS EMBRIÕES SOMÁTICOS (5ª FASE); C- PLÂNTULAS NORMAIS E ANORMAIS DE EMBRIÕES SOMÁTICOS CONVERTIDOS (5ª FASE); D- PLÂNTULA EM FORMAÇÃO (5ª FASE); E- PLÂNTULA DESENVOLVIDA SOBRE MEIO LÍQUIDO EM SUBSTRATO DE ALGODÃO (5ª FASE); F- SEQÜÊNCIA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA ATÉ A FORMAÇÃO DA PLÂNTULA; G- PLÂNTULA DESENVOLVIDA E TRANSPLANTADA EM SUBSTRATO DE PLANTMAX® NA CASA DE VEGETAÇÃO.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na propagação por estaquia semi-lenhosa e herbácea indicam que a guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) é uma espécie de difícil enraizamento, pois não houve formação de raízes em nenhum dos experimentos, com a utilização do etanol e do AIB.

A propagação *in vitro* por micro-estacas coletadas em casa de vegetação ou a campo não foi possível devido à contaminação bacteriana.

A micro-estaquia a partir de plântulas obtidas de germinação *in vitro* é possível até a fase de enraizamento *in vitro*.

Na cultura de meristemas é possível a eliminação da contaminação bacteriana.

É possível a propagação desta espécie por meio da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros retirados de frutos em fase de pré-maturação ou iniciando a maturação. A indução foi possível em meio de cultura MS acrescido de 0,5 a 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Houve formação de embriões somáticos de forma direta e indireta. Os embriões somáticos se desenvolveram e se converteram, formando plântulas.

ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS NÚMERO DE ESTACAS COM FORMAÇÃO DE CALO NA BASE, NÚMERO DE ESTACAS COM GEMAS INCHADAS, NÚMERO DE ESTACAS COM BROTAÇÕES, E NÚMERO DE ESTACAS VIVAS PARA A ESTAQUIA SEMI-LENHOSA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.).

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios			
		Nº estacas com calo na base	Nº estacas com gemas inchadas	Nº estacas com brotações	Nº estacas vivas
Substrato	1	5,755	0,021 ^{NS}	0,617 ^{NS}	0,475 ^{NS}
Regulador	6	0,451 ^{NS}	0,035 ^{NS}	0,337 ^{NS}	0,180 ^{NS}
Substrato x Regulador	6	0,799 ^{**}	0,056 ^{NS}	0,235 ^{NS}	0,200 ^{NS}
Erro	42	0,231	0,155	0,265	0,129
C.V. %	-	28,53	11,79	15,35	7,60
χ^2	-	20,082 ^{NS}	6,090 ^{NS}	13,535 ^{NS}	7,668 ^{NS}

^{NS} não significativo
^{**} significativa a 1% de probabilidade
 c.v. coeficiente de variação
 χ^2 teste de Bartlett

ANEXO 2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS NÚMERO DE ESTACAS COM RETENÇÃO DE FOLHAS E NÚMERO DE ESTACAS VIVAS PARA A ESTAQUIA HERBÁCEA DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	
		Nº estacas com retenção de folhas	Nº estacas vivas
Tempo	1	6,236 ^{**}	5,405 ^{**}
Regulador	5	17,197 ^{**}	10,331 ^{**}
Tempo x Regulador	5	1,369	0,902 ^{NS}
Erro	36	0,404	0,705
C.V. %	-	113,613	34,58
χ^2	-	176,181	10,845 ^{NS}

^{NS} não significativo
^{**} significativa a 1% de probabilidade
^{*} significativa a 5% de probabilidade
 C.V. coeficiente de variação
 χ^2 teste de Bartlett

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ
SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO
DEPARTAMENTO DE FISCALIZAÇÃO
CENTRO DE DIAGNÓSTICO MARCOS ENRIETTI

1451/97

LAUDO OFICIAL

PROTOCOLO Nº1541/97

Proprietário: UFPR Setor Fitotecnia Fitossanitarismo	
Endereço:	
Município: Curitiba	
Telefone:	
Remetente: Engº Agº Marcia Scutti (Micropropagação)	CREA-PR:
Endereço:	
Material enviado: Guabiroba	
Exame: Bacteriológico	Entrada: 09/6/97
	Saída: 11/6/97

RESULTADO

AMOSTRA	MICROORGANISMO ISOLADO	AM	AP	CF	CL	ET	GN	CN	NO	NT	PN	PO	SF	ST	TT	NV
	<i>Erwinia sp</i> (col.amarela)	S	S	R	S	R	S	S	S	R	-	R	R	R	S	R
	<i>Erwinia sp</i> (col.branca)	S	R	R	S	I	S	S	S	R	-	-	R	R	R	R

CÓDIGO DOS ANTIBIÓTICOS

código dos resultados

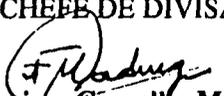
AM-Amicacina
 AP-ampicilina
 CF-Cefalotina
 CL-Cloranfenicol
 ET-Estreptomicina

GN-Gentamicina
 CN-Canamicina
 NO-Neomicina
 NT-Nitrofurantoina
 PN-Penicilina

PO-Polimixina
 SF-Sulfonamidas
 ST-Sulfa/Trimetoprim
 TT-Tetraciclín
 NV-Novobiocina

S-Sensível
 R-Resistente
 I- Intermediário
 - -Não testado

obs: A Presente Análise Tem Seu Valor Restrito Somente À Amostra Entregue No CDME

CHEFE DE DIVISÃO

Francisco Carvalho Madruga
 Méd.Vet. CRMV-PR/0516

TÉCNICO RESPONSÁVEL

Roberto Tomaz
 Engº Agº CREA -PR/ 9097

1ª VIA REMETENTE 2ª VIA DEFIS 3ª LABORATÓRIO

ANEXO 3. LAUDO OFICIAL DO CENTRO DE DIAGNÓSTICO MARCOS ENRIETTI

ANEXO 4. TABELAS COM OS RESULTADOS DOS TESTES DE DESINFESTAÇÃO 4, 5, 6 E 7 DA MICRO-ESTAQUIA DE PLANTAS NA CASA DE VEGETAÇÃO.

TESTE 4. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) (APÓS LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE POR 20 min E IMERSÃO EM ETANOL A 70% POR 10 s) NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos*	Contaminados (%)		Não contaminados (%)
	Fungos	Bactérias	
NaOCl 2,5% - 5 min.	20	80	0
NaOCl 2,5% - 10 min.	40	90	0
NaOCl 5% - 5 min.	20	90	0
NaOCl 5% - 10 min.	10	90	0
NaOCl 10% - 5 min.	40	60	0
NaOCl 10% - 10 min.	30	100	0

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 5. EFEITOS DA IMERSÃO POR 10 min EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) (APÓS 6 h EM SOLUÇÃO DE BENOMYL A 0,5% SEGUIDA DE 1 h DE LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE) NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos*	Contaminadas (%)		Não contaminadas (%)	
	Fungos	Bactérias	Vivas	Mortas
NaOCl 5% - 10 min	75,00	75,00	6,25	0
NaOCl 10% - 10 min	62,50	75,00	0	6,25

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 6. EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) (APÓS 4 h DE LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE SEGUIDA DE IMERSÃO EM ETANOL A 70% POR 15 s) NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos*	Contaminadas (%)		Não contaminadas (%)
	Fungos	Bactérias	
NaOCl 10% - 10 min.	15	100	0
NaOCl 10% - 20 min.	10	95	0

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 7. EFEITOS DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) (APÓS 2 min DE IMERSÃO EM ETANOL A 70%) NA DESINFESTAÇÃO DE MICRO-ESTACAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE PLANTAS MATRIZES MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos*	Contaminadas (%)		Não contaminadas (%)	
	Fungos	Bactérias	Vivas	Mortas
NaOCl 10% - 10 min.	5	95	0	5
NaOCl 10% - 30 min.	10	90	0	10

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

ANEXO 5. TABELAS COM OS RESULTADOS DOS TESTES 2, 3, 4, 5 E 6 DE DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DA MICRO-ESTAQUIA DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS.

TESTE 2. EFEITO DA IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 10% POR 10 min NA DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) RETIRADAS DE FRUTOS MADUROS E SECAS À SOMBRA POR 2 DIAS.

Tratamento*	Não contaminadas (%)		Contaminadas (%)
	Germinadas	Não germinadas	
NaOCl 10% - 10 min.	3,57	89,28	7,14

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 3. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) EM 30 min DE IMERSÃO NA DESINFESTAÇÃO DE FRUTOS SEMI-MADUROS INTEIROS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) DOS QUAIS FORAM ISOLADAS AS SEMENTES.

Tratamentos*	Contaminadas (%)	Não contaminadas (%)	
		Germinadas	Não germinadas
NaOCl 10% - 30 min.	13,33	31,66	55,01
NaOCl 20% - 30 min.	23,33	25	51,67

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 4. EFEITO DA IMERSÃO POR 30 min EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 30% NA DESINFESTAÇÃO DE FRUTOS MADUROS INTEIROS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) DE ONDE FORAM ISOLADAS AS SEMENTES.

Tratamento*	Contaminadas (%)	Não contaminadas (%)	
		germinadas	Não germinadas
NaOCl 30% - 30 min	26,26	14,89	58,84

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 5. EFEITO DA IMERSÃO EM ÁLCOOL 70% POR 1 min SEGUIDA DA IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 30% POR 30 min NA DESINFESTAÇÃO DE FRUTOS SEMI-MADUROS INTEIROS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) DOS QUAIS FORAM ISOLADAS AS SEMENTES.

Tratamento*	Contaminadas (%)		Não contaminadas (%)	
	Fungo	Bactéria	Geminadas	Não germinadas
NaOCl 30% - 30 min.	30	10	40	20

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 6. EFEITO DA IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 10% POR 15 min NA DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) RETIRADAS DE FRUTOS MADUROS.

Tratamento*	Contaminadas (%)	Não contaminadas (%)		
		Geminadas	Não germinadas	Geminada morta
NaOCl 10% - 15 min.	1,66	96,11	1,66	0,55

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

ANEXO 6. TABELAS COM OS RESULTADOS DOS TESTES 4, 5, 6, 7 E 8 DE DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DA CULTURA DE MERISTEMAS.

TESTE 4. EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 10% NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS AXILARES DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) ISOLADOS COM 2 PRIMÓRDIOS FOLIARES DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos*		Explantos não contaminados (%)		Contaminação (%)	
		Vivo	Morto	Fungo	Bactéria
NaOCl 10%	5 min	0	65	0	35
	10 min	5	55	0	40
	20 min	10	85	0	5
	40 min	10	90	0	0

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 5. EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 10% NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS AXILARES DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) ISOLADOS COM 4 PRIMÓRDIOS FOLIARES DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos*		Explantos não contaminados (%)		Contaminação (%)	
		Vivos	Mortos	Fungo	Bactéria
NaOCl 10%	10 min	45	20	0	35
	20 min	45	40	0	15
	40 min	30	70	0	0

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 6. EFEITO DA IMERSÃO EM ÁLCOOL 70% POR 10 s SEGUIDA DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 10% E DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP E AIB NO MEIO DE ISOLAMENTO NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS AXILARES DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) ISOLADOS COM 4 PRIMÓRDIOS FOLIARES DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos*		Explantos não contaminados (%)		Contaminação (%)	
Desinfestação	Reguladores de crescimento	Vivos	Mortos	Fungos	Bactérias
		NaOCl 10% - 10 min	1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	0	30
NaOCl 10% - 10 min	0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	0	20	30	50
NaOCl 10% - 20 min	1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	0	30	10	60
NaOCl 10% - 20 min	0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,1 mg.L ⁻¹ AIB	0	20	20	60

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 7. EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 10% E DA ADIÇÃO OU NÃO DE BAP E AIB NO MEIO DE ISOLAMENTO NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS AXILARES DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) ISOLADOS COM 2 PRIMÓRDIOS FOLIARES DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos*		Explantos não contaminados (%)		Contaminação (%)	
Desinfestação	Reguladores de crescimento	Vivos	Mortos	Fungos	bactérias
		NaOCl 10% - 10 min	Testemunha	14,28	35,71
NaOCl 10% - 10 min	1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ AIB	7,14	7,14	7,14	85,71
NaOCl 10% - 20 min	Testemunha	0	42,85	0	57,14
NaOCl 10% - 20 min	1 mg.L ⁻¹ BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ AIB	7,14	7,14	7,14	85,71

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

TESTE 8. EFEITO DA IMERSÃO EM ÁLCOOL 70% POR 10 s SEGUIDA DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl) A 40% POR 15 NA DESINFESTAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE MERISTEMAS DE GEMAS LATERAIS INCHADAS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) COLETADAS DE ÁRVORES ADULTAS A CAMPO.

Tratamento*	Explantos não contaminados (%)		Contaminação (%)	
	Vivos	Mortos	Fungos	Bactérias
NaOCl 40% - 15 min	0	12,5	50,00	75,00

* NaOCl refere-se a solução comercial de hipoclorito de sódio na concentração de 10-12%.

ANEXO 7. TABELAS COM OS RESULTADOS DOS TESTES 1, 2 E 3 DA PRIMEIRA FASE DE DESENVOLVIMENTO E MULTIPLICAÇÃO DE MERISTEMAS.

TESTE 1. EFEITO DA ADIÇÃO DE BAP NO MEIO DE DESENVOLVIMENTO E MULTIPLICAÇÃO DE MERISTEMAS AXILARES DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamentos	Contaminação (%)		Presença de calo (%)	Comprimento médio (cm)	Desenvolvimento (%)	
	Fungo	Bactéria			Normal	Anormal
Testemunha	0	18,18	55,55	1,83	33,33	22,22
0,5 mg.L ⁻¹ BAP	18,18	18,18	63,63	0,37	36,36	27,27

TESTE 2. EFEITO DA ADIÇÃO DE BAP E AIB NO MEIO DE DESENVOLVIMENTO E MULTIPLICAÇÃO DE MERISTEMAS APICAIS DE BROTAÇÕES JOVENS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) DE ÁRVORES ADULTAS A CAMPO.

Tratamento	Não contaminados (%)		Contaminação (%)		Desenvolvimento dos vivos (%)	
	Vivos	Mortos	Fungos	Bactérias	Normal	Com calo
0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,05 mg.L ⁻¹ AIB	41,67	22,92	10,42	31,25	22,92	29,17

TESTE 3. EFEITO DA ADIÇÃO DE BAP E AIB NO MEIO DE DESENVOLVIMENTO E MULTIPLICAÇÃO DE MERISTEMAS APICAIS DE BROTAÇÕES JOVENS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) DE MATRIZES NA CASA DE VEGETAÇÃO.

Tratamento	Não contaminados (%)		Contaminação (%)		Desenvolvimento dos vivos (%)	
	Vivos	Mortos	Fungos	Bactérias	Normal	Com calo
0,5 mg.L ⁻¹ BAP + 0,05 mg.L ⁻¹ AIB	92,50	5,00	0	2,50	37,50	50,00

ANEXO 8. TABELA COM O RESULTADO DO TESTE PRELIMINAR DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.

TESTE 1. EFEITO DA COMBINAÇÃO DE BAP E 2,4-D NA INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) EM AMBIENTES ESCURO E COM POUCA LUZ, RETIRADOS DE FRUTOS DESENVOLVIDOS VERDES.

Tratamentos		Luminosi- dade	Contami- nados (%)	Embrião zigótico com epicótilo desenvolvido (%)	Presença de raiz (%)	Presença de calo (%)
Reguladores						
0,1 mg.L ⁻¹	2,4-D + 0,1 mg.L ⁻¹ BAP	Escuro	0	87,5	0	25
1,0 mg.L ⁻¹	2,4-D + 0,1 mg.L ⁻¹ BAP	Escuro	0	75	25	50
2,0 mg.L ⁻¹	2,4-D + 0,1 mg.L ⁻¹ BAP	Escuro	0	62,5	0	75
5,0 mg.L ⁻¹	2,4-D + 0,1 mg.L ⁻¹ BAP	Escuro	0	50	25	50
0,1 mg.L ⁻¹	2,4-D + 0,1 mg.L ⁻¹ BAP	Pouca	0	87,5	12,5	12,5
1,0 mg.L ⁻¹	2,4-D + 0,1 mg.L ⁻¹ BAP	Pouca	0	25	12,5	25
2,0 mg.L ⁻¹	2,4-D + 0,1 mg.L ⁻¹ BAP	Pouca	0	12,5	0	37,5
5,0 mg.L ⁻¹	2,4-D + 0,1 mg.L ⁻¹ BAP	Pouca	0	25	25	50

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTMAN, A.; GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of *Citrus* bud culture. **Acta Horticulturae**, n.78, p.51-60, 1977.
2. AMIN, M.N.; JAISWAL, V.S. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.9, n.3, p.235-243, 1987.
3. BACARIN, M.A.; BENINCASA, M.M.P.; ANDRADE, V.M.M.; PEREIRA, F.M. Enraizamento de estacas aéreas de goiabeira (*Psidium guajava* L.): efeito do ácido indolilbutírico (AIB) sobre a iniciação radicular. **Científica**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.71-79, 1994.
4. BARROS, I. de; PASQUAL, M. Contaminação fúngica, bacteriana e oxidação *in vitro* de explantes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí LCH-2077-2-5-44. **Ciência e Prática**, Lavras, v.15, n.2, p.145-53, 1991.
5. BIASI, L.A. **Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' através da cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de discos foliares**. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre. 1993, 163 p.
6. BIASI, L.A.; SÃO JOSÉ, A.R.; BILIA, D.A.C.; FORNASIERI, J.L. Influência do tipo de estaca na propagação vegetativa da goiabeira 'Supreme'. **Acadêmica**, Curitiba, ano 9, n.2, p.11-16, 1998.
7. CANHOTO, J.M.; CRUZ, G.S. Improvement of somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae) by manipulation of culture media composition. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v.30, n.1, p.21-25, 1994.

8. CASSELLS, A.C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: Technology and Application**. Dordrecht, Kleuver Academic Publishers, p.31-44, 1990.
9. CRMC – Coordenação da Região Metropolitana de Curitiba. **Dados básicos da região metropolitana de Curitiba**, 1984, 259 p.
10. CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v.III, p.510. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.
11. CRONAUER, M.S.S.; KRIKORIAN, A.D. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. **Plant Cell Reports**, v.7, n.1, p.23-25, 1988.
12. CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Foreign Plants**. 2.ed. New York : New York Botanical Garden, 1988.
13. CRUZ, G.S.; CANHOTO, J.M.; ABREU, M.A.V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. **Plant Science Limerick**, v.66, n.2, p.263-270, 1990.
14. DAL VESCO, L.L. **Indução e controle da embriogênese somática *in vitro* na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.)** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998, 108p.
15. ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. **Plant Cell Reports**, v.7, n.8, p.665-668, 1989.

16. FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas, UFPEL, 1995, 178p.
17. FIGUEIREDO, S.L.B.; KERSTEN, E.; SCHUCH, M.W. Efeito do estiolamento parcial e do ácido indolbutírico (IBA) no enraizamento de estacas de ramos de goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). **Scientia Agricola**, v.52, n.1, p.167-171, 1995.
18. FITCH, M.M.M.; MANSCHARDT, R.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Cell Reports**, v.9, n.6, p.320-324, 1990.
19. FOSSARD, R.A. de; FOSSARD, H. de. Micropropagation of some members of the Myrtaceae. **Acta Horticulturae**, n.227, p.346-351, 1988.
20. 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, CBAB, EMBRAPA / CNPH, p.183-260, 1998.
21. GUERRA, M.P.; PESCADOR, R.; DAL VESCO, L.L.; NODARI, R.O.; DUCROQUET, J.P.H.J. *In vitro* morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: somatic embryogenesis and plant regeneration. **Acta Horticulture**, n.452, p.27-36, 1997.
22. GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA-CNPH, v.2, p.533-568, 1999.

23. HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES Jr., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant Propagation, Principles and Practices**. Sixth Edition, 1997, 770p.
24. LITZ, R.E. *In vitro* somatic embryogenesis from cultured ovules of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (DC.) Berg). **Hort Science**, v.18, n.4, p.568, 1983.
25. LITZ, R.E. *In vitro* somatic embryogenesis from callus of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* D.C. Berg). **Hort Science**, v.19, n.1, p. 62-64, 1984.
26. LITZ, R.E.; JAISWAL, V.S. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation. Technology and Application**. Dordrecht, Kleuver Academic Publishers, p.247-263, 1990.
27. LLOYD, G.; McCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.**, v.30, p. 421-427, 1980.
28. MOHAMED YASSEEN, Y; BARRINGER, S.A.; SCHNELL, R.J.; SPLITTSTOESSER, W.E. *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. **Plant Cell Reports**, v.14, n.8, p.525-528, 1995.
29. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
30. MURASHIGE, T.; TISSERAT, B.; ESAN, E.B. Somatic embryogenesis in Angiosperms. **Horticultural Review**, New York, v.1, p.1-78, 1979.
31. OKKELS, F.T.; PEDERSEN, M.G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. **Acta Horticulturae**, n.225, p.199-207, 1988.

32. PASQUAL, M.; BARROS, I. de Influência da benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) sobre a proliferação e alongamento de brotações propagadas *in vitro* do porta-enxerto de pereira *Pyrus betulifolia* L.. **Ciência e Prática**, Lavras, v.15, n.1, p.54-63, 1991.
33. PEREIRA, F.M.; OIOLI, A.A.P.; BANZATTO, D.A. Enraizamento de diferentes tipos de estacas enfolhadas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em câmaras de nebulização. **Científica**, v.11, n.2, p.239-244, 1983.
34. PEREIRA, F.M.; PETRECHEN, E. de H.; BENINCASA, M.M.P.; BANZATO, D.A. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) das cultivares 'Rica' e 'Paluma', em câmara de nebulização. **Científica**, v.19, n.2, p.199-206, 1991.
35. PHILLIPS, R.; ARNOTT, S.M.; KAPLAN, S.E. Antibiotics in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. **Plant Science Letters**, v.21, p.235-240, 1981.
36. PLIEGO, A. F.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.12, n.1, p.61-66, 1988.
37. POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reports**, v.2, p.36-39. 1983.
38. RATHORE, H.S.; SINGH, S.M.; CHHABRA, A.D. Effect of plant regulators and their concentrations on the performance of soft-wood cuttings of guava. **Haryana Agricultural University Journal of Research**, v.5, n.2, p.146-157, 1975.

39. RIBAS, L.L.F. **Micropropagação e estudo da parada de crescimento durante a aclimatização de mudas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) CV. Gala, clone FZ.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991, 142p.
40. SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.; CANTLIFFE, D. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**, EMBRAPA-CNPQ, p.227-249, 1990.
41. SHARMA, K.K. Effect of IBA on rooting of cuttings of guava (*Psidium guajava* L.). **Punjab Horticultural Journal**, v.15, n.1-2, p.46-47, 1975.
42. SHARP, W.R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v.2, p.268-310, 1980.
43. SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura**. p.596-602. São Paulo, 1971.
44. TREEBY, M.T. Effect of indolebutyric acid on rooting kiwifruit and guava hardwood cuttings. **Plant Propagator**, v.28, n.4, p.7-10, 1983.
45. WANG, D.Y.; WERGIN, W.P.; ZIMMERMAN, R.H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. **Hort Science**, v.19, n.1, p.71-72, 1984.
46. ZANETTE, F. **Propagação da pereira *Pirus comunis* Var. Garber por estaquia lenhosa.** Tese (professor titular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995, 59p.