

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

**MICROPROPAGAÇÃO E MINIESTAQUIA
DE PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.)**

Daiane Silva Lattuada
Engenheira Agrônoma (UFRGS)

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2010

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO
Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

L365m Lattuada, Daiane Silva
Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia
uniflora* L.) / Daiane Silva Lattuada. — Porto Alegre : D.S.Lattua-
da, 2010.

xii, 75f; Il.

Dissertação(Mestrado - Horticultura) – Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

1. Pitangueira : Prática cultural : Reprodução vegetal. I. Título.

CDD: 635

DAIANE SILVA LATTUADA
Engenheira Agrônoma - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 19.03.2010
Pela Banca Examinadora



PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
Orientador - PPG Fitotecnia

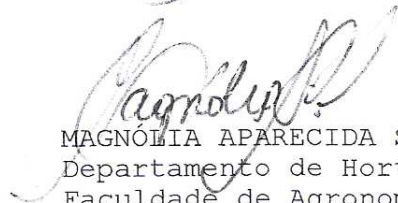
Homologado em: 27.04.2010
Por



PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia




GILMAR SCHÄFER
PPG Fitotecnia



MAGNÓLIA APARECIDA SILVA DA SILVA
Departamento de Horticultura e Silvicultura
Faculdade de Agronomia/UFRGS



MÁRCIA WULFF SCHUCH
Universidade Federal de Pelotas
UFPel



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter sempre iluminado meu caminho e por permitir a realização de mais uma conquista em minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao professor Prof. Paulo Vitor Dutra de Souza, pelo apoio e orientação.

Aos colegas da Pós-graduação, em especial à Mônica, Luana, Vanessa, Precila, Claudimar, Mateus e Felipe pela colaboração e amizade ao longo desse trabalho.

A todos que de uma forma ou de outra colaboraram na execução deste trabalho.

Obrigada

MICROPROPAGAÇÃO E MINIESTAQUIA DE PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.)¹

Autora: Daiane Silva Lattuada

Orientador: Paulo Vitor Dutra de Souza

RESUMO

A pitangueira (*Eugenia uniflora*) é uma importante espécie frutífera representante do gênero *Eugenia*, família Myrtaceae, possui potencial ornamental e fitoterápico, podendo ser incluída em projetos de revegetação de áreas degradadas. No Brasil a maioria dos pomares dessa espécie são formados por mudas do tipo pé-franco, o que torna os plantios com baixa uniformidade genética. Métodos de propagação vegetativa como o cultivo *in vitro* e a miniestaquia são alternativas viáveis para propagação de diversas espécies frutíferas, podendo ser utilizado também com as espécies nativas proporcionando a formação de pomares com populações de plantas homogêneas, além de acelerar o processo de propagação. No entanto, um dos maiores entraves na propagação vegetativa da pitangueira está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e, ainda, por oxidações causadas pela liberação de compostos fenólicos no ponto de incisão. Neste contexto, conduziu-se dois estudos visando a multiplicação da pitangueira, no Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS, no período de 2008 a 2010. O estudo 1 concentrou-se em métodos de assepsia e tratamento de plantas matrizes, meios de cultivo e concentrações de reguladores de crescimento. No estudo 2 testou-se a estaquia com material herbáceo de pitangueira. Os resultados obtidos indicam a possibilidade do cultivo *in vitro* de pitangueira, quando tratados os explantes com solução bactericida e estabelecendo-os em meio WPM com 0,2mg.L⁻¹ de BAP para a fase de multiplicação e 0,1mg.L⁻¹ de ANA para a fase de enraizamento. No entanto, ainda há necessidade de melhoria nos percentuais de enraizamento e brotação dos explantes, bem como na redução de explantes oxidados e contaminados. A miniestaquia foi eficiente para produzir mudas, especialmente, quando utilizadas estacas oriundas de plantas jovens na ausência de auxinas exógenas. Contudo, ainda há a necessidade de aprimorar a técnica visando a multiplicação a partir de estacas coletadas de planta adulta de genótipos promissores.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (75p.) – Março, 2010.

MICROPROPAGATION AND MINICUTTING OF SURINAM CHERRY (*Eugenia uniflora* L.)¹

Author: Daiane Silva Lattuada
Advisor: Paulo Vitor Dutra de Souza

ABSTRACT

The surinam cherry (*Eugenia uniflora*) is an important fruit species, representative of the genus *Eugenia*, Family Myrtaceae, which has ornamental and herbal potential and could be included in projects in degraded disturbed areas. In Brazil, most of this species orchards are formed by planting ungrafted plants, which gives low genetic uniformity to the plantations. Vegetative propagation methods, such as micropropagation and minicutting, are viable alternatives for the propagation of several fruit species and can also be used with the native species, allowing the formation of orchards with homogeneous populations and accelerating the propagation process. However, one of the biggest obstacles in surinam cherry propagation is the difficulty of obtaining free from fungi and bacteria contamination tissue and also by oxidation due to the phenolic compounds liberation at the incision point. In this context, two surinam cherry multiplication studies were carried out, both at the Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, for the period 2008 to 2010. Study 1 focused on sterilization methods and mother plants treatment, culture medium and growth regulators concentrations. In study 2 minicuttings of surinam cherry were tested. The results indicate the possibility of *in vitro* cultivation of surinam cherry when the explants were treated with antibacterial solution and established in culture medium with 0.2 mg.L⁻¹ BAP for multiplication and 0.1 mg.L⁻¹ NAA for rooting. However, there is still a need for improvement of rooting and sprouting percentage of the explants, and the reduction of oxidized and contaminated explants. The minicutting was efficient to produce seedlings, especially when obtained from young plants with not exogenous auxin. Although, the necessity to improve the technique continues, aiming to multiply starting from adult plant collected cuttings from promising genotypes.

¹ Master's of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (75p.) – March, 2010.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 Pitangueira.....	04
2.2 Micropropagação.....	10
2.3 Estaquia.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Estudo 1. Estudos para elaboração de protocolo para micropropagação de pitangueira.....	20
3.1.1 Experimento 1. Tratamento das plantas matrizes com fungicida e/ou bactericida no momento da assepsia dos explantes.....	21
3.1.2 Experimento 2. Tratamento das microestacas com bactericida em distintas concentrações de álcool etílico e solução de ácido ascórbico, no momento da assepsia.....	23
3.1.3 Experimento 3. Teste de meios de cultivo e imersão em água precedendo a inoculação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de pitangueira.....	25
3.1.4 Experimento 4. Multiplicação e enraizamento <i>in</i> <i>vitro</i> e aclimatização de explantes obtidos a partir de segmentos nodais de pitangueira.....	27
3.2 Estudo 2. Estudo para propagação vegetativa por miniestaquia de pitangueira.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Estudo 1. Estudos para elaboração de protocolo para micropropagação de pitangueira.....	32
4.1.1 Experimento 1. Tratamento das plantas matrizes com fungicida e/ou bactericida no momento da assepsia dos explantes.....	32
4.1.2 Experimento 2. Tratamento das microestacas com bactericida em distintas concentrações de álcool etílico e solução de ácido ascórbico, no momento da assepsia.....	34

	Página
4.1.3 Experimento 3. Teste de meios de cultivo e imersão em água precedendo a inoculação <i>in vitro</i> de segmentos nodais de pitangueira.....	36
4.1.4 Experimento 4. Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de explantes obtidos a partir de segmentos nodais de pitangueira.....	40
4.2 Estudo 2. Estudo para propagação vegetativa por miniestaquia de pitangueira.....	48
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8. APÊNDICES.....	73

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Valor nutricional de 100g de polpa de frutos de pitangueira.....	05
2. Características físico-químicas do fruto de pitangueira cultivada em diferentes regiões do Brasil.....	06
3. Teores de compostos fenólicos e carotenóides totais em duas seleções de pitanga.....	07
4. Acessos de <i>Eugenia uniflora</i> L. em bancos de germoplasma.....	08
5. Tratamentos utilizados para o experimento de desinfestação de explantes de pitangueira. Porto Alegre, 2009.....	24
6. Tratamentos envolvendo meios de cultivo e tempos de imersão dos explantes de pitangueira inoculados <i>in vitro</i> . Porto Alegre, 2009.....	26
7. Tratamentos utilizados para a multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de explantes de pitangueira nas etapas 1 e 2. Porto Alegre, 2009.....	28
8. Contaminação por bactérias ou fungos, oxidação e sobrevivência dos explantes de pitangueira inoculados <i>in vitro</i> , após tratamentos da planta matriz. Porto Alegre, 2008.....	32
9. Contaminação (bactérias e fungos), oxidação e sobrevivência dos explantes de pitangueira inoculados <i>in vitro</i> , após tratamento dos explantes com solução do bactericida tetraciclina diluída em ácido ascórbico ou diferentes concentrações de álcool; após 20 e 50 dias da inoculação. Porto Alegre, 2008.....	35
10. Sobrevivência relativa dos explantes de pitangueira aos 20 e 50 dias após os tratamentos de pré-lavagem e inoculação em distintos meios de cultivo. Porto Alegre, 2009.....	37
11. Contaminação bacteriana relativa e oxidação relativa dos explantes de pitangueira aos 50 dias após os tratamentos de pré-lavagem e inoculação em distintos meios de cultivo. Porto Alegre, 2009.....	38

	Página
12. Número de brotações por explante de pitangueira aos 50 dias após os tratamentos de pré-lavagem e inoculação em distintos meios de cultivo. Porto Alegre, 2009.....	39
13. Calogênese relativa de explantes de pitangueira aos 50 dias após os tratamentos de pré-lavagem e inoculação em distintos meios de cultivo. Porto Alegre, 2009.....	40
14. Sobrevivência relativa, número de brotações por frasco, número de raízes por frasco e qualidade das brotações de pitangueira subcultivados para meios de cultivo suplementados com ANA ou BAP Porto Alegre, 2009.....	47
15. Calogênese relativa de explantes de miniestacas de pitangueira. Porto Alegre, 2009.....	52
16. Enraizamento relativo de miniestacas de pitangueira. Porto Alegre, 2009.....	54
17. Oxidação relativa de miniestacas de pitangueira. Porto Alegre, 2009.....	56

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Escala de qualidade das brotações a) índice 1 – brotação recém emergida; b) 2- brotação com três a cinco folhas distinguíveis e até 0,3cm de altura; c) 3- brotação com quatro a seis folhas expandidas e até 0,5cm de altura; d) 4- brotação com mais de seis folhas expandidas e acima de 0,5cm de altura e e) 5- explantes com regeneração completa de plântulas. Porto Alegre, 2009..... 29
2. a) Percentual de sobrevivência de explantes; b) Número de brotações por explante; c) Escala de qualidade das brotações de explantes inoculados em meios WPM suplementados com doses de BAP. Porto Alegre, 2009..... 41
3. Explantes emitindo regeneração de plântulas completas (T2- WPM + 0,1mg.L⁻¹ ANA, T3- WPM + 0,2 mg.L⁻¹ ANA), Porto Alegre, 2009..... 44
4. a) Percentual de sobrevivência de explantes; b) Número de brotações por explante; c) Escala de qualidade das brotações; d) Percentual de enraizamento e e) Percentual de calogênese de explantes de pitangueira inoculados em meios de cultivo WPM suplementados com doses de ANA. Porto Alegre, 2009..... 45
5. a) Explantes oriundos de meios de cultivo WPM suplementados com ANA e subcultivados para meios WPM com BAP, b) explantes oriundos de meios de cultivo WPM suplementados com BAP e subcultivados para meios WPM com ANA; c) Plântulas micropropagadas na fase de aclimatização *ex vitro*. Porto Alegre, 2009..... 48
6. a) Percentual de sobrevivência; b) retenção foliar (nº folhas por estaca) e c) emissão foliar em miniestacas de pitangueira. Porto Alegre, 2009..... 50

7. a) Calogênese em estacas de planta matriz adulta, b) estaca emitindo nova brotação, c) estacas de planta adulta, não submetidas à imersão e sem adição de auxina, d) estacas de planta adulta, submetidas à 24 horas de imersão e sem adição de auxina, e) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e sem adição de auxina, f) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e com adição 2000mg.L^{-1} de AIB, g) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e com adição 4000mg.L^{-1} de AIB, h) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e com adição 4000mg.L^{-1} de AIB, i) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e com adição 6000mg.L^{-1} de AIB, j) estacas de planta jovem, submetidas à 24 horas de imersão e sem adição de auxina, l) estacas de planta jovem, submetidas à 24 horas de imersão e com adição 2000mg.L^{-1} de AIB; Porto Alegre, dezembro de 2009..... 53
8. a) Massa fresca de parte aérea, b) massa fresca de raiz; c) massa seca de parte aérea; d) massa seca de raiz; e) número de folhas e f) área foliar.. Porto Alegre, 2009..... 57

ABREVIATURAS

ANA	Ácido Naftaleno Acético
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido Indol Butírico
BAP	6-Benzilaminopurina
BA	6-Bezilamina
CAC	Casca de arroz carbonizada
DHS	Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia/ UFRGS
DSD1	Meio de cultivo desenvolvido para micropropagar videira elaborado por Silva & Doazan, 1995.
GA ₃	Ácido Giberélico
MS	Meio de cultivo desenvolvido por Murashige & Skoog, 1962
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WPM	Meio de cultivo Wood Plant Medium elaborado por Lloyd & McCown, 1981
µM	micromol

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo (estimado em 43,1 milhões de toneladas), depois de China e Índia (Anuário brasileiro da fruticultura, 2008). A produção brasileira está voltada para frutas tropicais, subtropicais e temperadas, graças a sua extensão territorial, posição geográfica, solo e condições climáticas. No país são exploradas 500 variedades de plantas produtoras de frutas comestíveis e 220 espécies de frutíferas nativas somente na Amazônia (Anuário brasileiro da fruticultura, 2008).

Essas frutíferas nativas brasileiras podem constituir uma alternativa em nichos de mercado que buscam novidades e com uma renda adicional para os pequenos produtores. Entretanto, muito pouco se conhece sobre a grande maioria destas espécies. No Sul do país, as fruteiras nativas, especialmente algumas da família Myrtaceae, possuem potencial para exploração econômica.

A família Myrtaceae compreende aproximadamente 100 gêneros e 3.500 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, com centros de diversidade na América tropical e Austrália, e poucas espécies ocorrem em regiões temperadas (Barroso, 1984). Aproximadamente um terço dessas espécies pertence ao gênero *Eugenia*, que apresenta ampla distribuição,

ocorrendo desde o México até a Argentina, com cerca de 1000 espécies (McVaugh 1968; Johnson & Briggs 1984).

De acordo com Manica (2002), dentre todos os gêneros da família Myrtaceae que englobam espécies fruteiras, apenas quatro gêneros (*Myrciaria*, *Acca*, *Psidium*, e *Eugenia*) têm importância econômica. No gênero *Myrciaria* estão as jabuticabeiras (*Myrciaria cauliflora*), com mais de uma dezena de espécies nativas do centro Sul/Sudeste brasileiro, e o camu-camu (*Myrciaria dubia* H. B. K. (McVough)). Entretanto, embora muitos autores ainda incluam as jabuticabeiras neste gênero, Sobral (1985) classifica-as no gênero *Plinia*. No gênero *Acca* está a feijoa (*Acca selowiana*), enquanto que no gênero *Psidium* estão agrupadas mais de 10 espécies, todas nativas das Américas (Manica, 2002).

O gênero *Eugenia* está inserido na subfamília Myrtoideae, o qual inclui todos os gêneros de Myrtaceae que apresentam frutos carnosos (Lughadha & Proença, 1996) e ao qual pertence a pitangueira (*E. uniflora*). Este gênero encontra-se bem representado nas diversas formações vegetais do Brasil, não apenas quanto à riqueza específica, mas também quanto à abundância e frequência de suas espécies (Klein 1984; Peixoto & Gentry 1990; Leitão Filho 1993; Barroso & Peron 1994; Chagas & Silva *et al.* 1995; Rodrigues & Nave 2000; Arantes & Monteiro 2002). Muitas dessas espécies são ricas em óleos essenciais e taninos, e são frequentemente utilizadas na medicina popular (Pio Corrêa 1984; Neves & Donato 1989; Pott & Pott 1994; Lunardi *et al.* 2001) e na indústria farmacêutica. Além disso, o óleo essencial da pitangueira também é descrito como agente fumigante contra o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), podendo ser utilizado no controle integrado desta praga (Neves *et al.*, 2009). São, também,

fornecedoras de frutos comestíveis, podendo-se citar *E. involucrata* DC. (cereja-do-mato), *E. pyriformis* Cambess. (uvaia), *E. brasiliensis* Lam (grumixama) e *E. uniflora* L. (pitanga), que são apreciadas, tanto pelo homem como pela fauna silvestre (Pott & Pott 1994, Marchiori & Sobral 1997, Lorenzi 1998).

A pitangueira ocorre espontaneamente em grande parte do território brasileiro, incluindo o Rio Grande do Sul, onde a produção de mudas desta espécie é tradicionalmente feita através da propagação sexuada, o que muitas vezes resulta em problemas fitossanitários e de homogeneidade do pomar. Neste sentido são necessárias mudanças no processo de propagação desta espécie, tais como: produzi-las em cultivo protegido e de forma assexuada.

Diante disso, métodos de propagação vegetativa de plantas, como a micropropagação e a estaquia, podem propiciar uma produção de mudas em larga escala, fixando genótipos de interesse agrícola e com boas condições fitossanitárias. Para tanto, o presente trabalho teve como objetivos propagar a pitangueira (*E. uniflora* L.) através das técnicas de cultivo *in vitro* e da miniestaquia de forma a contribuir para o conhecimento dos métodos de propagação desta espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

A pitangueira (*Eugenia uniflora*) é uma importante representante do gênero *Eugenia* e é encontrada na Argentina, Paraguai, Uruguai e no Brasil. Neste último, é distribuída da Bahia ao Rio Grande do Sul, ocorrendo em todas as formações vegetais deste Estado. Seu nome comum tem origem indígena, do tupi *pi'tãg*, que significa vermelho, em alusão à cor do fruto (Donadio et al., 2002).

Sanhotene (1989) descreve a pitangueira como uma arvoreta, ou árvore, com altura variando de 3 m a 12 m, e sistema radicular profundo, formado por uma raiz pivotante. O tronco é tortuoso, com manchas claras acinzentadas, com diâmetro de até 40 cm. A copa apresenta forma arredondada, com diâmetro de projeção variando de 3 m a 5 m, quando em cultivo isolado.

As folhas são simples, opostas, ovaladas ou ovado-oblongas, de bordos lisos, ápice atenuado-acuminado a obtuso, base obtusa a subcordada, às vezes atenuada ou aguda, de dimensões variando de 2,5 cm a 7 cm de comprimento por 1,2 cm a 3 cm de largura, e coloração verde-escura, lustrosas e com consistência membranácea. Os pecíolos medem entre 1mm e 2mm, podendo chegar a 5mm. São de coloração verde-escura, lustrosas e de consistência subcóriácea (Sanhotene, 1989).

A pitangueira é uma espécie frutífera e ornamental, podendo ser incluída em projetos de revegetação de áreas degradadas (Reitz *et al.* 1988; Lorenzi 1992; Marchiori & Sobral 1997; Backes & Irgang 2002). Apresenta potencial para ser utilizada na medicina como antidiarréica, antitérmica, diurética e hipotensora (Sanchoatene 1985; Rotman 1995). Possui óleo essencial que pode ser utilizado com ação digestiva, em cosméticos ou como acaricida. Os frutos, ricos em ferro, cálcio e fósforo (Tabela 1), são usados para fazer xarope, e as folhas, esmagadas, servem como repelentes contra insetos (Neves & Donato 1989).

TABELA 1. Valor nutricional de 100g de polpa de frutos de pitangueira.

Componente	Valor
Valor energético	51,00 cal
Umidade	85,80 g
Proteína	0,80 g
Gordura	0,40 g
Carboidratos	12,50 g
Fibra	0,60 g
Cinza	0,50 g
Vitamina A (retinol)	635,00 mg
Vitamina B1 (tiamina)	0,30 mg
Vitamina B2 (riboflavina)	0,60 mg
Vitamina B3 (niacina)	0,30 mg
Vitamina C (ácido ascórbico)	14,00 mg
Cálcio	9,00 mg
Fósforo	11,00 mg
Ferro	0,20 mg

Fonte: Villachica *et al.*, 1996.

O fruto ainda se destaca pelos elevados teores de vitamina A encontrados na polpa (Tabela 1). De acordo com Beitune *et al.* (2003), a vitamina A, também chamada de retinol, possui inúmeras funções de grande importância para o ser humano, especialmente na visão, na reprodução e no sistema imunológico.

Segundo Villachica *et al.* (1996), o fruto de pitanga é formado aproximadamente, de 66% de polpa e cerca de 34% de semente em alguns genótipos (Tabela 2). No entanto estes valores e outras características físico-químicas variam de acordo com as diferentes regiões de cultivo, bem como do manejo da cultura.

TABELA 2. Características físico-químicas do fruto de pitangueira cultivada em diferentes regiões do Brasil.

Características	Porto Alegre/RS		Selvíria/MS	Itambé/PE	Jaboticabal/SP	Valores de referência*
	2006	2008				
Peso do fruto (g)	3,49	4,77	4,00	3,00	4,80	-
% Polpa	80,09	90,67	-	88,40	74,60	-
% Semente	19,91	9,33	-	11,60	25,40	-
SST (°Brix)	10,60	11,80	8,30	8,60	11,60	> 6,00
ATT (%)	1,15	1,53	1,87	1,80	1,75	> 0,92
SST/ATT	9,10	7,70	-	4,80	6,62	-
Vitamina C (mg/100g)	54,89	46,24	-	-	22,87	-
Açúcares totais naturais (g/100g)	-	-	-	-	-	< 9,50
pH	-	-	-	-	-	>2,5 e <3,4

Adaptado de: Lira Júnior *et al.* 2007; Lopes, 2009.

* Instrução Normativa de nº 136, de 31 de março de 1999, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1999).

Embora o tamanho dos frutos seja uma característica importante para o mercado *in natura*, os teores de sólidos solúveis totais e a acidez total titulável, são as características mais relevantes, quando se trata da produção de frutos, como a pitanga, que é essencialmente voltada para industrialização (Lira Júnior *et al.* 2007).

A pitangueira, assim como outras espécies da família Myrtaceae, apresenta elevadas concentrações de compostos fenólicos. Esses compostos possuem propriedades antioxidantes, que podem estar relacionadas com o retardamento do

envelhecimento celular e a prevenção de algumas doenças (Wang *et al.*, 1996; Velioglu *et al.*, 1998). Lima *et al.* (2002) observaram que a pitanga roxa apresenta maiores teores de compostos fenólicos e carotenóides que a pitanga vermelha (Tabela 3), e que estes concentram-se mais na película do que na polpa do fruto maduro.

TABELA 3. Teores de compostos fenólicos e carotenóides totais em duas seleções de pitanga.

Determinação	Pitanga roxa		Pitanga vermelha	
	Madura	Semi-madura	Madura	Semi-madura
Fenólicos totais (mg/100g)*	325±24	257±12	257±3	252±4
Carotenóides totais (µg/g)**	111±2	98±1	104±0	79±1

*mg em equivalente de catequina/100g; **µg em equivalente de β-caroteno/g
Fonte: Lima *et al.*, 2000.

No Brasil e em outros países, centros de pesquisa mantêm bancos ativos de germoplasma da espécie (Tabela 4) com o objetivo de preservá-la e estudar seu potencial de cultivo, para que possa ser melhorada e incorporada aos sistemas produtivos, tornando-se uma nova alternativa aos produtores rurais. Segundo a Embrapa Clima Temperado, a pitangueira e o araçazeiro (com duas cultivares lançadas pela EMBRAPA, uma de película amarela, “Ya-Cy”, e outra de película roxa-avermelhada, “Irapuã”), são as espécies frutíferas nativas que apresentam maior potencial para cultivo em curto prazo, pois existem trabalhos adiantados de seleção de clones, os quais devem ser testados quanto às possibilidades de serem propagados como cultivares comerciais.

TABELA 4. Acessos de *Eugenia uniflora* L. em bancos de coleção de germoplasma.

Instituição	Local	Nº de acessos
Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA	Itambé, PE, Brasil	117
CATIE	Turrialba, Costa Rica	3
CIRAD - Station de Neufchateau - Sainte Marie	Guadeloupe, Antilhas Francesas	3
Crop Reserch Institute - Plant Genetic Unit	Ghana	1
Department of Agriculture - Tropical Fruit Research Station	New South Wales, Australia	1
Dirección de Investigaciones de Citros y Otros Frutales	Havana, Cuba	2
Embrapa Clima Temperado	Pelotas, RS, Brasil	150
Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA	Conceição do Almeida, BA, Brasil	4
INIA	Iquitos, Peru	5
Institute de Recherches Agricoles	Njombe, Camarões	1
Instituto Agrônomico de Campinas - IAC	Campinas, SP, Brasil	
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA	Manaus, AM, Brasil	2
National Genebank of Kenya	Kikuyu, Quênia	1
TARI - Chia Yi Agricultural Experiment Station	Chia-Yi, Taiwan	1
Tropical Pesticids Reserch Institute	Arusha, Tanzania	1
Universidade Estadual Paulista - UNESP	Jaboticabal, SP, Brasil	23
Universidade Federal da Bahia - UFBA	Cruz das Almas, BA, Brasil	12
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS	Eldorado do Sul, RS, Brasil	5
Universidade Federal de Viçosa - UFV	Viçosa, MG, Brasil	6
USDA - ARS - National Clonal Germplasm	Hilo, Havaí, Estados Unidos	2
USDA - ARS - Subtropical Reserch Station	Miami, Florida Estados Unidos	-

Adaptado de: Lira Júnior *et al.* 2007; Franzon, 2008; Lopes, 2009.

No Brasil, os dois principais pólos de pesquisa da pitangueira são a Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, com seleção de clones de elevado potencial produtivo para a região, e que lançou a única cultivar brasileira “tropicana” desenvolvida e adaptada à região da zona da mata de Pernambuco. E no sul do país, a Embrapa Clima Temperado de Pelotas, que

mantêm um banco ativo de germoplasma de espécies nativas, o qual possui cerca de 150 genótipos de pitangueira. Ainda, no Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia/UFRGS têm-se desenvolvido estudos com várias espécies nativas no estado, especialmente as frutíferas da família Myrtaceae. E estes têm o objetivo de, no decorrer do ano de 2010, instalar, na Estação Experimental Agronômica/UFRGS, uma coleção de plantas com estas espécies, à fim de estudar características agrícolas e fisiológicas das plantas.

A pitangueira produz frutos tanto por autofertilização quanto por polinização cruzada. Sendo que a autopolinização implica em aumento de endogamia, que por sua vez ocasiona diferenciação populacional (Franzon, 2008). A espécie é caracterizada pela floração em massa, com uma grande produção de flores em curto espaço de tempo (Silva & Pinheiro, 2007). Esse padrão de floração é uma estratégia da planta para atrair polinizadores, já que a espécie é autocompatível, porém necessita de polinizadores para uma maior taxa de frutificação (Franzon, 2008).

A maioria dos pomares brasileiros de pitangueira é formado por mudas do tipo pé-franco, ou seja, resultantes da propagação por sementes. Mudas assim propagadas não são recomendadas para a formação de pomares comerciais, pois além de retardar o início da produção de frutos, desenvolvem plantas desuniformes, quanto ao crescimento, floração e frutificação dificultando as atividades de manejo da cultura, inclusive a própria colheita (Lira Júnior *et al.*, 2007). Considerando-se a expansão e o elevado potencial de cultivo agroindustrial da pitangueira, recomenda-se a substituição de pés-francos por mudas propagadas vegetativamente (Bezerra *et al.*, 2000).

Neste contexto, métodos de propagação vegetativa seriam uma alternativa para a produção de mudas com características idênticas à planta matriz, permitindo a formação de pomares homogêneos quanto a produtividade, qualidade do fruto, precocidade e tolerância às pragas e doenças, além da antecipação do início da produção comercial, a partir da redução da fase juvenil da planta (Lira Júnior *et al.*, 2007).

Contudo, pouco se conhece sobre a resposta desta espécie quando submetida a estes métodos de propagação. No Brasil, grupos de pesquisa vêm estudando a enxertia para substituição da parte aérea, aproveitando-se de mudas de pé-franco adaptadas à região de cultivo como porta-enxerto. Bezerra *et al.* (1999), indica a garfagem no topo em fenda cheia e à inglesa simples como os métodos mais eficientes na propagação por enxertia da pitangueira, com até 77,5% de pegamento dos enxertos, em porta-enxertos de 9 meses de idade. A enxertia por borbulhia de placa em janela aberta, também pode ser adotada, com razoável sucesso segundo Bezerra *et al.* (2000), alcançando 56,7% de pegamento. Já a micropropagação e a estaquia são técnicas pouco exploradas para esta espécie.

2.2 Micropropagação

O cultivo *in vitro* é um método viável para propagação de diversas espécies frutíferas, podendo ser utilizado também com as espécies nativas proporcionando a formação de pomares com populações de plantas homogêneas além de acelerar os métodos de propagação convencional (Souza *et al.* 2007).

A micropropagação baseia-se no fenômeno da totipotência das células vegetais, ou seja, cada célula possui a capacidade de gerar uma nova planta,

permitindo a manutenção plena das características da planta-mãe, de modo uniforme, rápido crescimento e matéria-prima homogênea, uma vez que é possível obter várias cópias geneticamente idênticas de um mesmo indivíduo, livre de contaminações (Gamborg & Shyluck, 1981; Caldas *et al.*, 1990).

Murashige (1974) propôs três diferentes estágios para a micropropagação: Estágio I: seleção de explantes, desinfestação e cultivo destes em meio nutritivo, sob condições assépticas; Estágio II: multiplicação dos propágulos por meio de sucessivos subcultivos, em meios de cultura apropriados e; Estágio III: transferência das partes aéreas produzidas para meio de cultura com reguladores de crescimento indutores de raízes e o posterior transplante das mudas produzidas para substrato ou solo. Um protocolo completo de propagação de plantas consiste em descrever esses três estágios do processo para uma determinada espécie.

Muitos são os fatores que influenciam o comportamento do explante no meio de cultura, incluindo o órgão que serve como fonte de tecido, a idade fisiológica e ontogenética do órgão, o tamanho do explante, e acima de tudo, a qualidade da planta doadora (Thorpe & Patel, 1984). O controle da qualidade do material vegetal em si e a manipulação deste antes de se isolar o explante são aspectos importantes na cultura de tecidos. Esta manipulação inclui o manejo cultural e ambiental da planta matriz, pois os estados nutricional, fisiológico e fitossanitário desta têm grande influência no posterior comportamento do explante e da cultura. Plantas bem nutridas sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica, em geral, fornecem explantes de melhores qualidades (Grattapaglia & Machado, 1998).

Contudo, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas, está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e, ainda, por oxidações causadas pela liberação de compostos fenólicos (Thorpe *et al.*, 1991; Grattapaglia & Machado, 1998).

As contaminações provocadas por fungos e bactérias podem ser evitadas ou minimizadas com a manutenção da planta-matriz, doadora de explante, em casa-de-vegetação, situação que favorece a aplicação e ação de fungicidas e bactericidas (Grattapaglia & Machado, 1998). Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (Montarroyos, 2000).

A desinfestação de segmentos nodais em espécies lenhosas é a primeira etapa a ser considerada para a realização de um ótimo estabelecimento *in vitro* (Pierik, 1990). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. No entanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de microrganismos, que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (Medeiros, 1999).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), podem ser utilizados fungicidas e antibióticos durante a desinfestação ou incorporá-los ao meio nutritivo. O Benomil® (fungicida sistêmico) tem sido utilizado em diversos trabalhos no controle de contaminações fúngicas do meio e do material vegetal. Ele apresenta baixa toxicidade, de modo que não provoca fitotoxicidade ao tecido vegetal. Já os

antibióticos adicionados ao meio de cultivo, para o controle de contaminações bacterianas endógenas, possuem função bacteriostática e não bactericida, podendo ser fitotóxicos (Yepes & Aldwinckle, 1994, Grattapaglia & Machado, 1998; Peros *et al.* 1998) e conduzirem a alterações nas respostas morfogênicas. O objetivo de sua utilização, nesse caso, é o de manter o desenvolvimento do explante, reduzindo a multiplicação das bactérias dentro dos tecidos, de maneira que seja possível isolar explantes livres de contaminação. Como opção, pode-se utilizar material juvenil oriundo de sementes germinadas *in vitro*, em virtude da facilidade de assepsia e rápida resposta das brotações a essas condições. O estado juvenil das plantas possibilita maior crescimento da planta, produção de grande superfície foliar e maior produção de fotoassimilados a serem posteriormente utilizados no crescimento e desenvolvimento geral das plantas.

Os desinfestantes superficiais, como álcool ou hipoclorito de sódio, podem controlar apenas fungos, mas não garantem níveis aceitáveis de controle de bactérias (Vianna *et al.*, 1997).

Outro obstáculo a ser vencido no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas é a oxidação dos explantes. Esta ocorre pelo corte que danifica as células dos tecidos, promovendo a liberação de compostos fenólicos precursores da síntese de lignina, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (Andrade *et al.*, 2000), podendo levar a morte dos tecidos. Para evitar ou minimizar estes fatores, os pré-tratamentos aplicados às plantas doadoras de explantes são determinantes no processo de estabelecimento *in vitro*.

Durante o processo *in vitro*, o sucesso para a propagação vai depender de vários fatores, entre eles os fitorreguladores, que se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*. Dentre as citocininas, o BAP (6-benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias. Contudo, em algumas culturas, pode-se obter brotações pequenas, inadequadas para serem individualizadas para o enraizamento. Neste caso, necessita-se de uma fase de alongamento, sendo as giberelinas os principais reguladores vegetais utilizados com esta finalidade (Grattapaglia & Machado, 1998).

No que se refere à micropropagação da cultura da pitangueira, Olivier (1997) inoculou gemas axilares juvenis (destacadas dos ramos) e segmentos nodais oriundos de sementes germinadas, em meio de cultura contendo 1/2 MS (Murashige & Skoog, 1962) e MS na concentração total sendo suplementados, respectivamente, com concentrações de reguladores de crescimento 0,6 μM (micromol) e 1,12 μM 6-benziladenina (BA) e 0,15 μM e 0,3 μM ácido naftaleno acético (ANA). Os melhores resultados foram obtidos no meio básico MS completo contendo as concentrações de 1,12 μM BA e 0,3 μM ANA.

Na etapa seguinte, a rizogênese ou formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimatação às condições *ex-vitro*. No caso da maioria das espécies lenhosas, o enraizamento é a etapa mais difícil, principalmente quando se usa material na fase adulta (Hu & Wang, 1983). Segundo Assis & Teixeira (1998), as auxinas são as principais responsáveis pela

rizogênese, sendo os ANA e o AIB os mais utilizados, principalmente em plantas lenhosas.

2.4 Estaquia

Na fruticultura, a propagação assexuada ou vegetativa é utilizada largamente na produção de mudas, em função da necessidade de se garantir a manutenção das características varietais, que determinam o valor agrônômico do material a ser propagado, tais como uniformidade, produção, qualidade do fruto, precocidade e sanidade (Fachinello, 1995).

A estaquia é uma técnica de propagação vegetativa largamente utilizada na produção comercial de mudas, com boa qualidade e em curto espaço de tempo (Oliveira *et al.* 2001). O processo de formação de raízes em estacas é influenciado por um grande número de fatores, que podem atuar isoladamente ou em conjunto. Dentre esses, destacam-se as condições fisiológicas da planta matriz (presença de carboidratos, substâncias nitrogenadas, aminoácidos, auxinas, exsudação de compostos fenólicos e outras a presença ou não de substâncias não identificadas como os cofatores), a época, posição de coleta e diâmetro das estacas, a juvenilidade, o estiolamento, a presença de folhas e gemas, a idade da planta-matriz, o di e os fatores do ambiente, como disponibilidade de água, luminosidade e substrato (Hartmann *et al.*, 1990).

A indução do sistema radicular é provocada pela ação do ácido indol acético (AIA) uma auxina natural, que atua em conjunto com carboidratos, compostos nitrogenados e vitaminas. A primeira auxina isolada foi o AIA, que junto com o AIB formam o grupo de auxinas mais conhecidas (Benincasa & Leite, 2004). Além da concentração endógena de auxina, outros fatores influenciam o

enraizamento de estacas. A oxidação de compostos fenólicos, fenômeno responsável pela liberação de exsudados tóxicos ao tecido da estaca, tem sido apontada como fator que reduz a capacidade de enraizamento. O controle das reações de oxidação destes compostos pode vir a favorecer a formação de raízes (Fachinello *et al.*, 1994). Em algumas espécies, como as pertencentes à família das Mirtáceas, tal fenômeno é comumente observado, no ponto de corte, dificultando assim o enraizamento (Fachinello *et al.* (1995).

Esse entrave pode ser minimizado com o emprego de alguns reguladores vegetais, especificamente do grupo das auxinas e de co-fatores do enraizamento (Ono *et al.*, 1994; Zanette, 1995). Substâncias químicas, chamadas reguladores de crescimento podem ser utilizadas, quando necessárias, para o enraizamento com objetivo de aumentar a porcentagem de enraizamento, acelerar a formação de raízes, aumentar o número e a qualidade das raízes e uniformizar o enraizamento (Oliveira *et al.* 2001). As auxinas sintéticas são as substâncias mais utilizadas para promover a formação do primórdio radicular em estacas de várias espécies, sendo elas o AIA (ácido indolacético), o ANA e o AIB (Oliveira *et al.* 2001). Estas podem ser aplicadas através da embebição da base da estaca em solução de água e/ou outros solventes, bem como através de talcos onde são colocados os hormônios ou pela mistura com sais potássicos solúveis em água (Hartmann *et al.*, 1997). Estes mesmos autores citam a utilização de *sprays* na folhagem e base das estacas, bem como a imersão total das estacas na solução, como métodos alternativos na aplicação de reguladores de crescimento.

O tempo de imersão da base das estacas depende da concentração das soluções utilizadas. Soluções diluídas (0 a 500 mg.L⁻¹) necessitam ficar em

contato com a base das estacas por horas, enquanto nas soluções concentradas ($> 500 \text{ mg.L}^{-1}$), o contato com a base das estacas deve ser de segundos (Couvillon, 1988).

O tipo de estaca e a estação do ano também são fatores que influenciam a formação de raízes adventícias e vários autores verificaram o efeito desses fatores como Ferreira *et al.* (2001) e Dutra *et al.* (2002). Com relação à idade das plantas matrizes, em geral, estacas provenientes de material vegetativo juvenil enraízam com maior facilidade; quanto mais juvenis, mais rápida é a formação das raízes, melhor é a qualidade do sistema radicial formado e menor é a probabilidade de barreiras anatômicas que podem interferir negativamente para a formação de raízes adventícias (Hartmann *et al.*, 2002). Em espécies de fácil enraizamento, as estacas podem ser colhidas em qualquer época do ano, enquanto para outras espécies o período de maior enraizamento coincide com a estação de repouso ou com a estação de crescimento (Paiva & Gomes, 1993).

Diferentes espécies pertencentes à família Myrtaceae foram estudadas quanto ao enraizamento de estacas tratadas com AIB. Scarpate Filho *et al.* (1999) estudaram o enraizamento de estacas herbáceas de jabuticabeira 'Sabará' (*Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg.) originadas de brotações novas, de plantas matrizes submetidas a poda drástica (a 1 metro do solo), e tratadas com zero, 1000, 2000, 4000 e 8000 mg.L^{-1} de AIB, concluindo que a obtenção de material ontogeneticamente mais jovem não foi suficiente para formação de raízes, sendo que somente a associação das estacas com o regulador de crescimento (AIB) provocou o enraizamento (8,96% com 1000 mg.L^{-1} , 12,98% com 2000 mg.L^{-1} , 23,16% com 4000 mg.L^{-1} e 37,98% com 8000 mg.L^{-1}). Já, Duarte *et al.* (1997),

encontraram até 60% de enraizamento de *Myrciaria cauliflora*, utilizando AIB e não realizando poda drástica sobre as plantas matrizes antes da retirada das estacas.

Coutinho *et al.* (1991), utilizando AIB em estacas semi-lenhosas de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* Berg.), guabijuzeiro (*Myrcianthes punctens* Berg.), cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*), pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e araçazeiro amarelo (*Psidium cattlyanum* Sab.) verificaram que estacas de guabijuzeiro, cerejeira do mato e pitangueira não enraizaram mesmo quando tratadas. Já as estacas de goiabeira serrana e araçazeiro amarelo apresentaram baixa porcentagem de enraizamento, tanto sem tratamento (3,00 a 0,66% respectivamente), como com tratamento com AIB (6,33% com 5.000 mg.L⁻¹ a 2,66% com 1.000 mg.L⁻¹). Nachtigal *et al.* (1994) utilizaram 200, 300 e 400 mg.L⁻¹ de AIB, além do tratamento controle com água destilada, em estacas semi-lenhosas de araçazeiro, obtendo maior percentual de enraizamento (69,6%) e maior peso de matéria seca de raízes (0,22 g/estaca) com a concentração de 200 mg.L⁻¹ desta auxina.

Lopes (2009), utilizando diferentes doses de AIB (0, 1000, 2000 e 4000 ppm) em estacas semilenhosas (ápice, mediana e basal) de três espécies do gênero eugenia: grumixameira (*E. brasiliense*), cerejeira-do-mato (*E. involucrata*) e pitangueira (*E. uniflora*), não observou enraizamento independentemente da dose de AIB utilizada. Porém as estacas da região apical de cerejeira-do-mato apresentaram 100% de sobrevivência. A falta de resposta ao enraizamento de estacas semi-lenhosas de cerejeira-do-mato e de pitangueira tratadas com as mesmas doses de AIB (0, 1000, 2000, 4000 ppm) também foi observado por Coutinho *et al.* (1991). Lopes (2009) destaca que a ausência de enraizamento

pode estar relacionada a diversos fatores, dentre eles o tipo de estaca e a dose do regulador de crescimento utilizado, a liberação de compostos fenólicos que provocam a oxidação na região do corte da estaca, as condições inerentes ao ambiente da casa de vegetação, as peculiaridades genéticas do material em estudo com relação ao potencial destas em formar raízes, entre outros fatores que de alguma forma vem a influenciar na resposta das estacas ao enraizamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no período de março de 2008 a janeiro de 2010, nas instalações do Departamento de Horticultura e Silvicultura (DHS), localizado no Campus da Faculdade de Agronomia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre (RS).

O estudo foi dividido em duas etapas, buscando aprimorar metodologias para a propagação vegetativa de pitangueira (*E. uniflora* L.). Na primeira, denominada Estudo 1, foram realizados estudos para micropropagação da espécie, concentrando-se em métodos de assepsia e tratamento de plantas matrizes, meios de cultivo e concentrações de reguladores de crescimento. Na segunda etapa (Estudo 2) foram avaliados, em casa de vegetação, diferentes fatores, como idade da planta matriz, imersão das estacas em água, doses de AIB, visando melhorar a eficiência da propagação por miniestacas.

Em todos experimentos, a análise dos dados foi feita pelo sistema de análise estatística SANEST (Zonta & Machado, 1984).

3.1 Estudo 1. Estudos para micropropagação de pitangueira

O material vegetal utilizado foi coletado em várias regiões do Estado do Rio Grande do Sul e multiplicado via sementes na Estação Experimental Agronômica da UFRGS (Apêndice 1). Desta forma, dispôs-se de 80 mudas para cada um dos

cinco acessos de pitangueira coletados, sendo estes diferenciados pelas características fenotípicas e organolépticas dos frutos. Selecionou-se o acesso que apresentava melhores condições fitossanitárias e essas mudas foram transferidas para casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade na Faculdade de Agronomia (UFRGS).

As mudas foram cultivadas em sacos de polietileno preto de 3 litros (30X10X10cm), contendo substrato à base de resíduo decomposto de casca de acácia, solo São Jerônimo, casca de arroz carbonizada e areia média nas proporções 1:1:2:2 em volume, respectivamente. Durante todo o período as plantas receberam irrigações diárias por gotejamento (100 mL. planta⁻¹.dia⁻¹) e adubação quinzenal (10mL de solução contendo (8-6-8 de NPK e 1g.L⁻¹ da mistura de micronutrientes - Microsol® - contendo Ferro 5%, Zinco 3%, Cobre 0,2%, Molibdênio 0,003%, Magnésio 1%, Boro 0,1%).

3.1.1 Experimento 1. Tratamento das plantas matrizes com fungicida e/ou bactericida no momento da assepsia dos explantes.

Plantas matrizes mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade/UFRGS, foram dispostas em três blocos, ao acaso, de 30 plantas cada, em bancada de um metro de altura. Estas foram submetidas a três tratamentos fitossanitários, sendo eles: tratamento um: aplicação de fungicida (Benomil® 2g/L), tratamento dois: bactericida (Tetraciclina 60mg) e tratamento três fungicida (Benomil® 2g.L⁻¹) associado ao bactericida (Tetraciclina 60mg).

Nas plantas do tratamento um, aplicou-se quinzenalmente o fungicida Benomil®, com auxílio de pulverizador manual (500mL), durante três meses, nas plantas destinadas a receber os tratamentos para controle de fungos.

No tratamento dois a aplicação do bactericida Tetraciclina 60mg, deu-se nos explantes após sua coleta, já no laboratório de biotecnologia do DHS, no momento que antecedia a desinfestação destes. Um comprimido de tetraciclina 60mg foi diluído em 300mL de álcool 96%, no momento do tratamento do material vegetal (Precila Zambotto Lopes, informação verbal). Os explantes permaneceram sob agitação, imersos nesta solução por uma hora. Após este processo passaram para a etapa de desinfestação. O tratamento três consistiu da associação dos tratamentos um e dois.

O tratamento sem agente desinfestante (testemunha) não foi realizado, pois testes preliminares apresentaram praticamente 100% de contaminação bacteriana e fúngica, indicando, com isso a necessidade de desinfestação das fontes de explantes.

O material vegetal coletado (em 06/11/2008) e levado ao laboratório, foi primeiramente lavado e escovado com detergente neutro e escova, enxaguado e, após submetido à assepsia e tratamento bactericida, quando indicado no tratamento adotado.

A desinfestação adotada consiste de imersão das microestacas em álcool 70% por um minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% de ingrediente ativo (i.a.) adicionado do detergente Tween® 20 (4 gotas.L⁻¹), por 15 minutos. Após, os explantes sofreram a tríplex lavagem, com água deionizada autoclavada, na sala de inoculação em câmara de fluxo laminar estéril previamente esterilizada (limpeza das superfícies com álcool 70% e exposição à luz ultravioleta por 15 minutos).

Imediatamente após a assepsia, inoculou-se individualmente os explantes que mediam cerca de 1cm e com um nó, em tubos de ensaio (180x21mm) contendo 20mL do meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), onde ficaram apenas na superfície. Os tubos inoculados foram encaminhados para a sala de crescimento (temperatura $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$), onde permaneceram sete dias na ausência de luz. Na sequência, foram dispostos nas prateleiras e expostos a luz (16 horas de fotoperíodo), onde foram avaliados aos 20 dias após a inoculação.

Os parâmetros avaliados foram: os percentuais de contaminação bacteriana e fúngica isoladamente, oxidação e sobrevivência dos explantes. Considerou-se vivo o explante que apresentava-se verde e oxidado aquele com escurecimento completo dos tecidos.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, onde quatro repetições com dez tubos de ensaio compunha cada tratamento. As médias observadas foram analisadas estatisticamente e diferenciadas pelo teste de Duncan à 5% de probabilidade.

3.1.2 Experimento 2. Tratamento das microestacas com bactericida em distintas concentrações de álcool etílico e solução de ácido ascórbico, no momento da assepsia.

Microestacas, contendo dois a três segmentos nodais foram coletadas (em 04/02/2009) de plantas matrizes, mantidas em cultivo protegido, sem receber tratamento fitossanitário. O material levado ao laboratório permaneceu imerso em água por 24 horas (totalmente trocada a cada oito horas). Após, foram lavados e escovados com detergente neutro e escova; enxaguados e submetidos a quatro tratamentos com as diferentes soluções bactericidas (Tabela 5). O material foi

exposto a estas soluções por um período de 40 minutos e após passou pela assepsia com etanol 70% (um minuto), seguido de hipoclorito de sódio 2% (i.a) acrescido de Tween® 20 (4 gotas.L⁻¹) (15 minutos) e tríplice lavagem (água deionizada autoclavada) em câmara de fluxo laminar estéril.

TABELA 5. Tratamentos utilizados para o experimento de desinfestação de explantes de pitangueira. Porto Alegre, 2009.

Tratamentos	Constituintes da solução
T1	Ácido ascórbico (60mg) (300mL de água) + 1 comprimido de tetraciclina 60mg
T2	Solução de etanol 50% (300mL) + 1 comprimido de tetraciclina 60mg
T3	Solução de etanol 70% (300mL) + 1 comprimido de tetraciclina 60mg
T4	Solução de etanol 96% (300mL) + 1 comprimido de tetraciclina 60mg

Um comprimido de tetraciclina 60mg foi diluído para cada tratamento, em soluções de 300mL. No primeiro tratamento utilizou-se água como meio líquido acrescido de ácido ascórbico (200mg.L⁻¹). Nos seguintes tratamentos as soluções continham concentrações respectivamente crescentes de etanol (50, 70 e 90%). Todas as soluções foram preparadas no momento em que se efetuou o tratamento.

A inoculação do material foi realizada em tubos de ensaio (180X21mm) contendo 20mL de meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962). Em sala de crescimento, o material permaneceu, nos sete dias iniciais, sob escuro e após foi exposto a luz (16 horas de fotoperíodo).

Aos 20 e 50 dias após a inoculação *in vitro* do material foram feitas avaliações, onde, na primeira, avaliou-se os percentuais de contaminação por

bactérias ou fungos, oxidação e sobrevivência e, na segunda, somente avaliou-se a sobrevivência e oxidação dos explantes.

O delineamento experimental adotado foi o completamente casualizado, com quatro repetições de dez tubos de ensaio cada tratamento. As médias observadas foram transformadas para $\sqrt{(x+1)}$, analisadas estatisticamente e diferenciadas pelo teste de Duncan à 5% de probabilidade.

3.1.3 Experimento 3. Teste de meios de cultivo e imersão em água precedendo a inoculação *in vitro* de segmentos nodais de pitangueira.

Seis tratamentos compunham o experimento, onde foram testados tempos de imersão das microestacas em água para lavagem dos compostos fenólicos e meios de cultivo para estabelecimento *in vitro* da espécie (Tabela 6). A partir de plantas matrizes mantidas sob cultivo protegido, coletou-se caules herbáceos, que serviram como explantes (coleta em 09/03/2009). Metade do material coletado permaneceu, por 24 horas, imerso em água (trocada a cada oito horas) e a outra metade foi imediatamente inoculada.

TABELA 6. Tratamentos envolvendo meios de cultivo e tempos de imersão dos explantes de pitangueira inoculados *in vitro*. Porto Alegre, 2009.

Tratamentos	Tipo de meio de cultivo e tempo de imersão dos explantes em água
T1	WPM + imersão por 24 horas
T2	DSD1 + imersão por 24 horas
T3	MS + imersão por 24 horas
T4	WPM + sem imersão
T5	DSD1 + sem imersão
T6	MS + sem imersão

Os meios nutritivos escolhidos para o experimento foram o MS (Murashige & Skoog, 1962), DSD1 (Silva & Doazan, 1995) e WPM (Wood Plant Médium) (Apêndice 2). Verteu-se os meios nutritivos em frascos de vidro com tampas autoclaváveis, no volume de 30mL/frasco. Acrescentou-se a este, segundo Radmann *et al.* (2002), mio-inositol (100 mg.L^{-1}) e sacarose (30 g.L^{-1}). O pH foi ajustado para 5,8 e adicionado $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ de Agar com auxílio de pHmêtro marca Digimed/modelo DM20, o qual foi calibrado previamente ao uso com as soluções padrão de pH 7,00 e 4,00.

A limpeza dos explantes, em todos os tratamentos, (realizado antes da inoculação e após a imersão em água nos distintos tratamentos) consistia de quatro etapas: 1 - escovação e lavagem do material com sabão neutro, 2 - imersão em 300mL de solução bactericida (tetraciclina 60mg) e ácido ascórbico por 40 minutos, 3 - assepsia com etanol 70% (um minuto), seguido de solução de hipoclorito de sódio 2% (i.a) acrescido de Tween® 20 (4gotas por L) (15 minutos) e, 4 - tríplice lavagem em câmara de fluxo laminar estéril.

A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar estéril. Nos sete dias subseqüentes o material inoculado permaneceu na ausência de luz e, após, foi exposto a 16 horas de fotoperíodo.

As avaliações foram realizadas aos 20 e 50 dias após a inoculação *in vitro* do material. Aos 20 dias, já era possível observar-se os resultados quanto aos percentuais de sobrevivência, contaminação bacteriana e fúngica isoladamente, oxidação e brotação dos explantes vivos e aos 50 dias a sobrevivência e oxidação

dos explantes que permaneceram intactos, sem ter consumido todas as suas reservas.

O delineamento experimental adotado foi o completamente casualizado, com três repetições de cinco frascos, contendo quatro explantes em cada, para cada tratamento. As médias observadas foram transformadas para $\sqrt{(x+1)}$ e analisadas estatisticamente e diferenciadas pelo teste de Duncan à 5% de probabilidade.

3.1.4 Experimento 4: Multiplicação e enraizamento *in vitro* e aclimatização de explantes de pitangueira.

Mudas de pitangueira obtidas a partir de germinação *in vitro* serviram de matrizes para coleta de segmentos nodais, objetivando inoculá-los testando-se meios de cultivo suplementados com diferentes fitorreguladores e doses destes, afim de testar o estabelecimento da espécie pela fase de multiplicação ou de enraizamento.

O estudo contou com duas etapas, onde na etapa 1 haviam sete tratamentos (Tabela 7) testando a efetividade de três doses de ANA e três doses de BAP, sendo elas 0,1; 0,2 e 0,5mg.L⁻¹, e, ainda, uma testemunha onde não se acrescentou fitoreguladores ao meio de cultivo WPM (Wood Plant Medium).

Na etapa 2, explantes brotados (provenientes de meio de cultivo suplementado com BAP e da testemunha) foram subcultivados para meios nutritivos suplementados com 0,2mg.L⁻¹ de ANA. Enquanto que os explantes cultivados na primeira etapa com ANA e que apresentavam raízes formadas, passaram na etapa seguinte ao cultivo com 0,2mg.L⁻¹ BAP. As informações

referentes aos tratamentos da primeira etapa foram mantidas, afim de se detectar um possível efeito fitotóxico de doses elevadas do fitoregulador (Tabela 7).

TABELA 7. Tratamentos utilizados para a multiplicação e enraizamento *in vitro* e aclimatização de explantes obtidos a partir de segmentos nodais de Pitangueira que foram germinadas *in vitro* nas etapas 1 (um) e 2 (dois). Porto Alegre, 2009.

Tratamentos	Doses e tipo de fitoregulador	
	Etapa 1	Etapa 2
T1	WPM	WPM + 0,2mg.L ⁻¹ ANA
T2	WPM + 0,1mg.L ⁻¹ ANA	WPM + 0,2mg.L ⁻¹ BAP
T3	WPM + 0,2mg.L ⁻¹ ANA	WPM + 0,2mg.L ⁻¹ BAP
T4	WPM + 0,5mg.L ⁻¹ ANA	WPM + 0,2mg.L ⁻¹ BAP
T5	WPM + 0,1mg.L ⁻¹ BAP	WPM + 0,2mg.L ⁻¹ ANA
T6	WPM + 0,2mg.L ⁻¹ BAP	WPM + 0,2mg.L ⁻¹ ANA
T7	WPM + 0,5mg.L ⁻¹ BAP	WPM + 0,2mg.L ⁻¹ ANA

A inoculação dos segmentos nodais se deu em câmara de fluxo laminar estéril e mantiveram-se os frascos, em sala de crescimento, nas condições de 27±1 °C e fotoperíodo de 16h.

Nas avaliações realizadas ao 60 dias, pode-se analisar o percentual de sobrevivência, a contaminação (fungos e bactérias), a oxidação, a brotação adventícia por explante, o percentual de enraizamento e a calogênese. Ainda, as brotações advindas foram classificadas quanto ao seu crescimento e avaliadas subjetivamente, através de uma escala criada para este experimento, levando-se em consideração, número de folhas, tamanho e altura das brotações. Esta escala iniciava no índice 1 (um) até o 5 (cinco), sendo a nota 1 (um) dada a brotação recém emergida; 2 (dois): brotação com três a cinco folhas distinguíveis e até 0,3cm de altura; 3 (três): brotação com quatro a seis folhas expandidas e até 0,5cm de altura; 4 (quatro): brotação com mais de seis folhas expandidas e acima

de 0,5cm de altura; e 5 (cinco): mudas que apresentavam parte aérea e raiz desenvolvidas e prontas para a etapa de aclimatização *ex vitro* (Figura 1).

As plântulas completas, obtidas neste experimento, foram levadas à casa de vegetação, onde foram plantadas em bandejas multicelulares (124 células) com substrato CAC (casca de arroz carbonizada) umedecida e sob nebulização intermitente (irrigação de 1 minuto a cada 20 minutos).

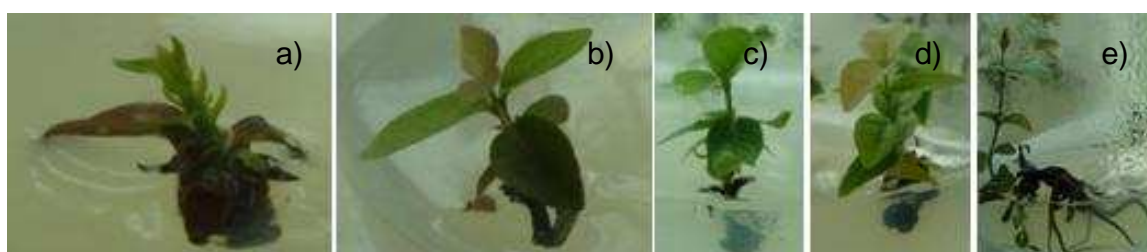


FIGURA 1. Escala de qualidade das brotações a) índice 1 - brotação recém emergida; b) 2 - brotação com três a cinco folhas distinguíveis e até 0,3cm de altura; c) 3 brotação com quatro a seis folhas expandidas e até 0,5cm de altura; d) 4 - brotação com mais de seis folhas expandidas e acima de 0,5cm de altura; e) 5 – explantes com regeneração completa de plântulas.

O delineamento experimental utilizado para a primeira etapa deste experimento foi completamente casualizado, onde quatro repetições, de dez frascos, com quatro explantes cada; compunha cada tratamento. As médias observadas foram transformadas para $\sqrt{(x+1)}$, e analisadas estatisticamente sendo diferenciadas pelo teste de Duncan à 5% de probabilidade de erro. Na segunda etapa adotou-se o delineamento experimental completamente casualizado, onde três repetições, de cinco frascos, com quatro explantes cada; compunha cada tratamento. As médias observadas foram analisadas estatisticamente e diferenciadas pelo teste de Duncan à 5% de probabilidade de erro. Devido ao

baixo número de plântulas não foi realizada análise estatística da etapa de aclimatização das plântulas em casa de vegetação.

3.2 Estudo 2. Estudo para propagação vegetativa por miniestaquia de pitangueira

Caules herbáceos de pitangueira foram coletados, em setembro no início da primavera, das plantas matrizes jovens (3 anos) mantidas em casa de vegetação e de uma planta adulta (mais de dez anos) em estágio de florescimento em Porto Alegre (30°1'27.90"S e 51°11'22.92"O, 46,97m de altitude) (INMET 2009).

Os tratamentos para induzir a rizogênese destas estacas constavam de quatro doses de AIB nas concentrações zero, 2000, 4000 e 6000mg.L⁻¹ e três tempos de imersão (zero, 24 e 48 horas) das estacas em água destilada precedendo a estaquia. Totalizou-se, assim, 24 tratamentos (Tabela 8) a partir de três fatores (idade da planta matriz, tempo de imersão em água após coleta das estacas e doses de AIB).

As estacas foram selecionadas quanto ao seu diâmetro médio (1,2mm), homogeneizadas com 5cm de comprimento e mantidas duas metades de folhas opostas. Na base da estaca realizou-se um corte em bisel com auxílio de bisturi, expondo-se assim, o câmbio. Imediatamente após o corte as estacas eram imersas em água, evitando a desidratação e assim que somavam dez, eram unidas e imersas nas soluções testadas no experimento. As estacas foram plantadas em bandejas multicelulares com 124 células preenchidas com CAC.

Todas as bandejas, tão logo estavam preenchidas eram levadas à câmara de nebulização intermitente (irrigação de 1 minuto a cada 20 minutos) no

laboratório de biotecnologia do departamento de horticultura e silvicultura da faculdade de agronomia.

Foram coletados os dados de temperatura média no período (Apêndice 3) e as avaliações foram realizadas aos 70 quanto a retenção de folhas, brotações novas e ao final do experimento percentual de enraizamento.

Aos 70 dias, o teste de miniestaquia foi finalizado e avaliado quanto à presença de raízes, calos ou oxidação na base do caule; parâmetros de crescimento das mudas quanto a área foliar por planta (cm^2), medida através de um medidor de área marca LI-Cor, modelo LI - 3100; número de folhas por planta; massa fresca e massa seca de parte aérea e raiz (g). O acúmulo de massa seca das raízes e parte aérea por planta foi obtido pela secagem em estufa, com temperatura de 65°C , até atingir peso constante.

O delineamento experimental adotado para a estaquia foi completamente casualizado com três repetições de 10 estacas para o teste de miniestaquia por tratamento e três repetições com cinco mudas, cada tratamento, para as análises de rizogênese e os parâmetros de crescimento da planta, respectivamente. Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias diferenciadas estatisticamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos para micropropagação de pitangueira

4.1.1 Experimento 1. Tratamento das plantas matrizes com fungicida e/ou bactericida no momento da assepsia dos explantes.

Não houve manifestação de fungos como agentes contaminantes do material vegetal neste estudo (Tabela 8). Vinte dias após a inoculação, 65% dos explantes oriundos de plantas matrizes submetidas ao tratamento somente com fungicida, apresentaram contaminação bacteriana (Tabela 8). Nos demais tratamentos não ocorreu nenhum tipo de contaminação. No entanto, a oxidação foi elevada nos tratamentos com bactericida e, quando associou-se bactericida e fungicida no tratamento, a oxidação expandiu afetando, inclusive, o meio de cultura (Tabela 8).

TABELA 8. Contaminação por bactérias ou fungos, oxidação e sobrevivência dos explantes de pitangueira inoculados *in vitro*, após tratamentos da planta matriz. Porto Alegre, 2008.

Tratamentos	Contaminação (%)	Oxidação (%)	Sobrevivência (%)
Benomil®	65,0 A	12,5 B	22,5
Benomil® + Tetraciclina	0,0 B	85,0 A	15,0
Tetraciclina	0,0 B	75,0 A	25,0
P>F	0,00	0,00	0,27
CV %	15,38	20,89	69,02

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Na sobrevivência dos explantes, não houve diferenças entre os tratamentos, ficando na faixa de 15% a 25% (Tabela 9).

Amaral (2006), ao estudar o controle da contaminação e oxidação de segmentos nodais de cedro (*Cedrela fissilis*), desinfestados com HgCl_2 e cultivados em quatro distintos meios de cultura ($\frac{3}{4}$ WPM; $\frac{3}{4}$ WPM + Benlate na concentração de 300mg.L^{-1} ; $\frac{3}{4}$ WPM + sulfato de estreptomicina na concentração de 10mg.L^{-1} e, $\frac{3}{4}$ WPM + benlate e streptomicina nas mesmas concentrações já citadas) observou que não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto a contaminação fúngica, necrose e sobrevivência, porém a presença do fungicida e bactericida associados ou somente da estreptomicina no meio de cultivo foram fundamentais para a redução da contaminação bacteriana. Contudo, no presente trabalho, observou-se maior oxidação na utilização de bactericida e na associação de bactericida e fungicida. Segundo Gratapaglia & Machado (1998), apesar de se realizar a desinfestação dos explantes, diversos microrganismos de natureza endógena não são expostos aos agentes desinfestantes e devem ser controlados já na planta matriz.

Caldas & Taketomi (1993) utilizaram concentrações que variaram de 10 a 100mg.L^{-1} de Benlate na desinfestação de explantes lenhosos de jabuticabeira, demonstrando que todas as concentrações foram eficazes na redução da contaminação. Por outro lado, neste estudo observou-se que somente os tratamentos que continham tetraciclina foram eficazes para reduzir a contaminação.

Segundo Cunha *et al* (2006), os antibióticos Mycoshield (oxitetraciclina) e Agrimicina (estreptomicina e tetraciclina) são utilizados na área agrônômica para

controle da bacteriose da batata causada por *Erwinia caratovora* e do pimentão e tomate causada por *Xanthomonas vesicatoria*; além da recomendação para essas culturas, a Agrimicina é utilizada em cafeiro, maracujazeiro, ameixeira e pêssegueiro. Embora sem eficiência comprovada, esses antibióticos também têm sido usados, em menor escala, para controle de bacteriose do eucalipto. Cunha *et al* (2006) estudando o efeito *in vitro* de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. observaram que os antibióticos sulfatos de amicacina, ceftriaxona, polimixina, oxitetraciclina e vancomicina inibiram o crescimento de isolados de bactérias fitopatogênicas, assim como no presente trabalho ao utilizar-se tetraciclina.

4.1.2 Experimento 2. Tratamento das microestacas com bactericida diluído em solução de ácido ascórbico ou álcool em diferentes concentrações, no momento da assepsia.

Na primeira avaliação, realizada 20 dias após a inoculação, verificou-se que a tetraciclina diluída em ácido ascórbico foi ineficiente para combater bactérias, tendo ocorrido 50% de contaminação com estes patógenos que foi diretamente proporcional à redução na dose de álcool (Tabela 9). A diluição do bactericida em etanol foi eficiente para controlar a contaminação, independente da concentração do mesmo, contudo aumentou a oxidação dos explantes (Tabela 9). A contaminação por fungos não foi afetada pelos tratamentos, sendo igual ou inferior a 7,5% de explantes atacados (Tabela 9). Em todos tratamentos foi observada a ocorrência de contaminação e oxidação concomitantemente em alguns explantes.

TABELA 9. Contaminação (bactérias e fungos), oxidação e sobrevivência dos explantes de pitangueira inoculados *in vitro*, após tratamento dos explantes com solução do bactericida tetraciclina diluída em ácido ascórbico ou diferentes concentrações de etanol; após 20 e 50 dias da inoculação. Porto Alegre, 2008.

Tratamentos associados à Tetraciclina	Contaminação (%)		Sobrevivência (%)		Oxidação (%)	
	Bactérias	Fungos	20 dias	50 dias	20 dias	50 dias
Ác. Ascórbico	50,0 A	2,5	42,5 B	40,0 A	12,5 C	12,5 C
Etanol 50%	25,0 B	5,0	67,5 A	0,0 B	47,5 B	65,0 B
Etanol 70%	20,0 B	5,0	0,0 C	0,0 B	75,0 A	75,0 AB
Etanol 96%	12,5 B	7,5	0,0 C	0,0 B	87,5 A	87,5 A
P>F	0,01	0,85	0,00	0,00	0,00	0,00
CV %	52,34	52,07 (ns)	38,56	40,82	21,55	18,5

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%, ns não significativo. Dados transformados $\sqrt{(X+1)}$.

Os tratamentos com ácido ascórbico e etanol 50%, viabilizaram a sobrevivência de 42,5% e 67,5% dos explantes, respectivamente (Tabela 9), aos 20 dias. No entanto, 47,5% dos explantes submetidos ao tratamento com etanol 50% oxidaram, sendo que, parte deste percentual, apresentava sinais de divisão celular. No restante dos tratamentos não houve sobrevivência dos explantes, devido ao esgotamento das reservas do material (devido à ausência de fitorreguladores no meio de cultivo) ou à elevada oxidação dos mesmos, evidenciando o efeito negativo de elevadas concentrações de etanol na assepsia, que propicia a liberação de compostos fenólicos pelos explantes. Também, para o estabelecimento *in vitro* de gemas caulinares de teca (*Tectona grandis* L.), segundo Shirin & Sarkar (2003), foram detectados grandes problemas com relação à produção de compostos fenólicos e à baixa resposta morfogênica dos explantes, sendo que a utilização de solução de ácido bórico e ácido ascórbico a 0,1 % apresentou resultados satisfatórios para a minimização dos efeitos da oxidação no cultivo *in vitro* desta espécie vegetal (Shirin *et al.*, 2005).

Do material que permaneceu vivo na primeira avaliação, após 50 dias de inoculação verificou-se que apenas 40% daqueles submetidos à assepsia com solução contendo ácido ascórbico sobreviveram (Tabela 9). O restante do material oxidou ao longo do período ou esgotou as reservas dos tecidos, já que no meio de cultivo não foram adicionados fitoreguladores que estimulam o desenvolvimento das plântulas.

Segundo Erig & Schuch (2005) a sobrevivência dos segmentos nodais é indicada pela coloração verde do explante. Entretanto, a alta porcentagem de sobrevivência dos segmentos nodais nem sempre pode ser usada como indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir destes explantes. Muitas vezes, como no presente trabalho, os tecidos dos segmentos nodais continuam vivos (de coloração verde), no entanto, não emitem folhas ou brotos, isto é, não se estabelecem *in vitro*, o que pode ser justificado pelo grau de desenvolvimento da gema do explante.

Mesmo ocorrendo uma alta taxa de contaminação bacteriana, o tratamento com ácido ascórbico, apresentou maior sobrevivência, sugerindo que um ajuste neste método de desinfestação, quanto a redução de contaminações, possa auxiliar no estabelecimento da espécie *in vitro*.

4.1.3 Experimento 3. Teste de meios de cultivo e imersão em água precedendo a inoculação *in vitro* de segmentos nodais de pitangueira.

A pré-lavagem dos explantes por 24 horas, antecedendo a inoculação propiciou maior sobrevivência dos explantes aos 20 dias após os tratamentos, independente do meio de cultivo adotado (Tabela 10). De qualquer maneira,

independente da lavagem e do meio de cultivo, aos 50 dias de inoculação, houve uma mortalidade pronunciada dos explantes, que superam os 91,7% (Tabela 10)

TABELA 10. Sobrevivência relativa dos explantes de pitangueira aos 20 e 50 dias após os tratamentos de pré-lavagem e inoculação em distintos meios de cultivo. Porto Alegre, 2009.

Tempo de pré-lavagem	Sobrevivência aos 20 dias (%)			
	Meios de cultivo			Média
	WPM	MS	DSD1	
24h	65,0	62,5	50,0	59,1 A
0h	25,0	15,0	5,0	15,0 B
CV%	36,50 (ns)			
Tempo de pré-lavagem	Sobrevivência aos 50 dias (%)			
	WPM	MS	DSD1	Média
	24h	7,5	5,0	12,5
0h	7,5	0,0	0,0	2,5 B
MÉDIA	7,5	0,0	6,2	
CV%	60,47 (ns)			

Médias seguidas por letras distintas na coluna entre si pelo teste de Duncan a 5%. Dados transformados $\sqrt{(X+1)}$.

A redução na sobrevivência, observada aos 50 dias em relação à avaliação realizada aos 20 dias, pode ter ocorrido devido ao esgotamento das reservas do explante, já que este não recebeu estímulo de reguladores de crescimento para iniciar a divisão celular, além da proliferação de agentes contaminantes (fungos e bactérias) e a oxidação (Tabela 11).

Não houve diferença entre os tratamentos quanto ao desenvolvimento de fungos, onde aproximadamente 30% dos explantes contaminaram. No entanto, quanto a presença de bactérias, houve interação entre os tratamentos, sendo os tratamentos DSD1 sem lavagem e MS com 24 horas de pré lavagem os mais prejudicados com 95% e 35%, respectivamente (Tabela 11).

Silva *et al* (2007) estudando o efeito da iluminação e pré-lavagem das brotações para o estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), obtiveram efeito negativo da pré-lavagem e do sombreamento para a

contaminação fúngica, enquanto que para contaminação bacteriana, oxidação e sobrevivência não houve efeito dos tratamentos com médias de 47,5%; 17,36% e 21,13%; respectivamente. Resultado diferente foi observado neste estudo, onde a pré-lavagem além de aumentar a sobrevivência dos explantes, ainda mostrou-se eficaz para redução da ocorrência de bactérias com efeito significativo nos meios MS e DSD1 (Tabela 11), contudo elevou o percentual de oxidação especialmente no meio de cultivo MS (Tabela 11).

TABELA 11. Contaminação bacteriana relativa e oxidação relativa dos explantes de pitangueira aos 50 dias após os tratamentos de pré-lavagem e inoculação em distintos meios de cultivo. Porto Alegre, 2009.

Tempo de Pré-lavagem	Meios de Cultivo					
	WPM		MS		DSD1	
	Contaminação bacteriana (%)					
24h	35	a A	7,5	b B	25	ab B
0h	55	b A	52	b A	95	a A
CV %	30,70					
Tempo de Pré-lavagem	Oxidação (%)					
	WPM		MS		DSD1	
24h	55	A ab	65	A a	35	A b
0h	10	B ab	25	A a	0	B b
CV%	27,95					

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Dados transformados $\sqrt{(X+1)}$.

A lavagem dos explantes foi prejudicial à multiplicação daqueles explantes cultivados no meio DSD1, mas mostrou-se benéfica para aqueles cultivados no meio WPM (Tabela 12). Para os explantes cultivados no meio MS a pré-lavagem não influenciou sobre o número de brotações. A baixa concentração iônica dos meios WPM e DSD1 pode ter contribuído no processo de indução de brotação de gemas nos segmentos nodais dessa espécie. Melo et al. 1999, já haviam observado que o meio MS, para espécies lenhosas, não se mostrava satisfatório em alguns

casos, e que composições de meios de cultivo mais diluídas em macronutrientes têm melhor desempenho. Formulações especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas como, por exemplo, o meio WPM, têm sido descritas e utilizadas freqüentemente como alternativa ao meio MS.

TABELA 12. Número de brotações por explantes de pitangueira aos 50 dias após os tratamentos de pré-lavagem e inoculação em distintos meios de cultivo. Porto Alegre, 2009.

Tempo de Pré-lavagem	Meios de Cultivo		
	WPM	MS	DSD1
24h	1,05 Aa	0,70 Aa	0,65 Ba
0h	0,33 Ba	0,60 Aa	1,34 Aa
CV %	33,97		

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p > 0,05$). Dados transformados $\sqrt{(X+1)}$.

Resultado similar ao deste experimento foi encontrado por Soares *et al.* (2005), ao trabalharem com a multiplicação de segmentos caulinares de goiabeira-serrana e pitangueira, em meios de cultura WPM e MS, com ausência e presença de BAP, onde verificaram que para as duas espécies de mirtáceas estudadas, o meio WPM com a presença de 2,2 μM BAP, foi essencial para a multiplicação destas. Além de salientarem que a espécie de *Eugenia* (pitangueira) tem maior potencial para a multiplicação *in vitro*.

Ainda com resultado similar Mantovani *et al.* (2001) observaram que o meio WPM proporcionou um maior estímulo ao desenvolvimento das gemas axilares de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel), tanto em número de brotações formadas (63,3% de gemas induzidas desenvolveram brotações), quanto no comprimento destas (2,19 cm de comprimento médio), quando comparado ao meio MS. Da mesma forma para caixeta (*Didymopanax*

morototoni), o meio WPM produziu melhores resultados do que o meio MS (Mantovani *et al.* 1999).

A calogênese foi observada especialmente no meio de cultivo MS seguido do meio WPM (Tabela 13), que são aqueles com maior concentração de sais.

Assim como constatado neste trabalho, alguns autores verificaram que meios de cultura mais diluídos em macronutrientes, como o WPM e o DSD1 e também modificações e diluições do MS têm apresentado bons resultados na micropropagação de algumas espécies frutíferas (Dal Vesco & Guerra, 1999; Pérez-Tornero & Burgos, 2000 e Soares *et al.*, 2005).

TABELA 13. Calogênese relativa de explantes de pitangueira aos 50 dias após os tratamentos de pré-lavagem e inoculação em distintos meios de cultivo. Porto Alegre, 2009.

Tempo de Pré-lavagem	Calogênese (%)			
	Meios de Cultivo			Média
	WPM	MS	DSD1	
24h	4,00	5,25	2,75	4,00 A
0h	0,25	0,00	0,00	0,08 B
Média	2,12 ab	2,62 a	1,37 b	
CV%	35,71			

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p > 0,05$). Dados transformados $\sqrt{(X+1)}$.

4.1.4 Experimento 4. Multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de explantes obtidos a partir de segmentos nodais de pitangueira.

Os meios WPM suplementados com doses de BAP propiciaram resposta linear negativa quanto à sobrevivência dos explantes, sendo considerada a dose mais alta dessa citocinina, fitotóxica (Figura 2A). Quanto à emissão de brotação adventícia e a qualidade das mesmas, a resposta do experimento utilizando-se

BAP foi quadrática, ocorrendo incremento até as doses de 0,21mg.L⁻¹ e 0,17mg.L⁻¹ respectivamente, a partir das quais saturaram e passaram a ser prejudicial na maior concentração utilizada (Figuras 2B e 2C).

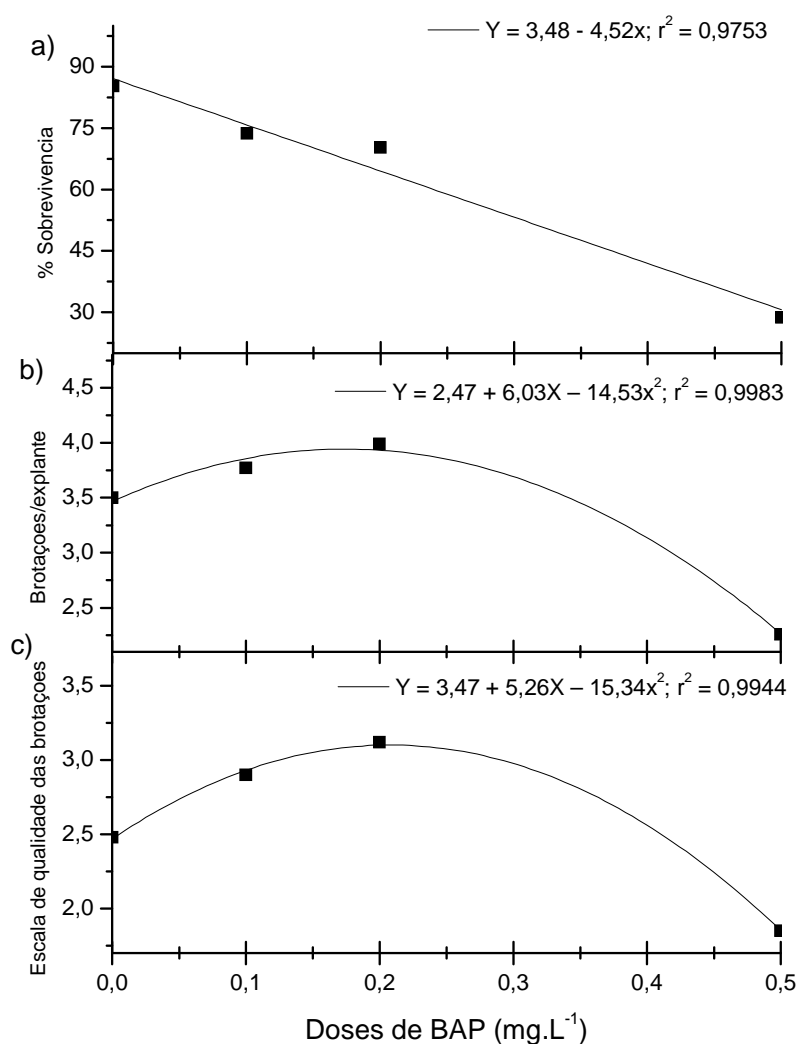


FIGURA 2. a) Percentual de sobrevivência de explantes; b) Número de brotações por explante; c) Escala de qualidade das brotações de explantes inoculados em meios de cultivo WPM suplementados com doses de BAP. Porto Alegre, 2009.

Embora o BAP seja utilizado na maioria dos sistemas experimentais *in vitro*, verifica-se que as culturas apresentam diferentes sensibilidades a essa citocinina dependendo do meio de cultura utilizado e da fase de cultivo. Deschamps & Pinto (1995) observaram resposta diferente ao BAP que a encontrada no atual experimento, já que as brotações de sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.) apresentaram um maior desenvolvimento em meio WPM sem reguladores de crescimento, e que a adição de BAP foi responsável pela redução do número de folhas por explante e também pela redução do comprimento das brotações.

Porém Soares *et al.* (2005) tiveram resultados similares aos desse estudo ao utilizar meios de cultura WPM e MS, com ausência e presença de BAP na multiplicação de segmentos caulinares de goiabeira-serrana e pitangueira, onde verificaram que para as duas espécies de mirtáceas estudadas, a presença de 2,2 μ M BAP, em meio WPM, foi essencial para a multiplicação destas. Da mesma forma em teca (*Tectona grandis* L.) foi observado aumento no número de brotos e o seu alongamento quando utilizaram adição exógena de baixas concentrações de auxinas e citocininas (Tiwari *et al.*, 2002). Entretanto, Fermino Jr. *et al.* (2009) obtiveram baixos números de brotos e menor altura das brotações de teca em pequenas concentrações de BAP, existindo, portanto, uma concentração hormonal exógena ótima para a micropropagação desta espécie.

De modo geral, observa-se em pitangueira que altas concentrações de BAP para as variáveis analisadas são consideradas de menor eficiência nas respostas organogênicas *in vitro*, reduzindo principalmente a sobrevivência, a quantidade e qualidade dos brotos formados. Este resultado está de acordo com Souza *et al.* (2008) que; ao submeteram segmentos caulinares em diferentes tipos e

concentrações de citocininas (BAP; zeatina; 2iP- isopenteniladenina) em meio WPM, concluíram que a menor concentração (5,0 μM BAP) mostrou-se mais promissora.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), as citocininas constituem o grupo de fitorreguladores indispensável para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, o tipo e a concentração das mesmas são os fatores que mais influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro*. O uso de baixas concentrações de BAP ao meio de cultura também tem sido indicado como eficiente na multiplicação de brotos para espécies lenhosas como paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) (Cordeiro *et al.*, 2004), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) e sucupira branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.), espécies estudadas por Ponte (1999) e Coelho (1999).

Os resultados obtidos para as variáveis percentagem de sobrevivência em meios suplementados com BAP ou ANA, estão de acordo com os resultados encontrados por Dal Vesco & Guerra (1999), por Soares *et al.* (2005) e por Lopes (2009) para feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burr.), para pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e para cerejeira-do mato (*Eugenia involucrata* D.C.), respectivamente.

Rizogênese e calogênese foram observadas em explantes submetidos a meio de cultivo adicionado ou não de auxina, além de, nas doses de 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹ de ANA ter ocorrido regeneração de plântulas completas (Figura 3). O material inoculado em WPM suplementado com ANA, apresentou resposta quadrática positiva aos tratamentos, quanto as variáveis sobrevivência, percentual de enraizamento e calogênese (Figuras 4A, 4D e 4E). A dose de 0,26 mg.L⁻¹ de

ANA com maior sobrevivência e desenvolvimento de calos e a dose de $0,24\text{mg.L}^{-1}$ de ANA a de maior rizogênese (Figuras 4A, 4D e 4E).



FIGURA 3. Explantes exibindo regeneração de plântulas completas (T2- WPM + $0,1\text{mg.L}^{-1}$ ANA, T3 - WPM + $0,2\text{mg.L}^{-1}$ ANA,). Porto Alegre, 2009.

Leitzke *et al.* (2009), ao estudarem meios de cultivo (MS e WPM), concentrações de AIB (0; 3; 6; 9 e $12\mu\text{M}$) e tempo de cultivo (quatro semanas em meio com AIB ou uma semana em meio com AIB mais três semanas em meio sem auxina) para o enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira, concluíram que, assim como neste estudo, o meio WPM com baixas concentrações de AIB (abaixo de $3\mu\text{M}$) induziu maiores médias de enraizamento e comprimento de raízes, enquanto que as altas doses induziram a formação de calos. Ainda, maior percentual de enraizamento foi observado quando o material foi cultivado uma semana com auxina, seguida de três semanas em meio livre de regulador.

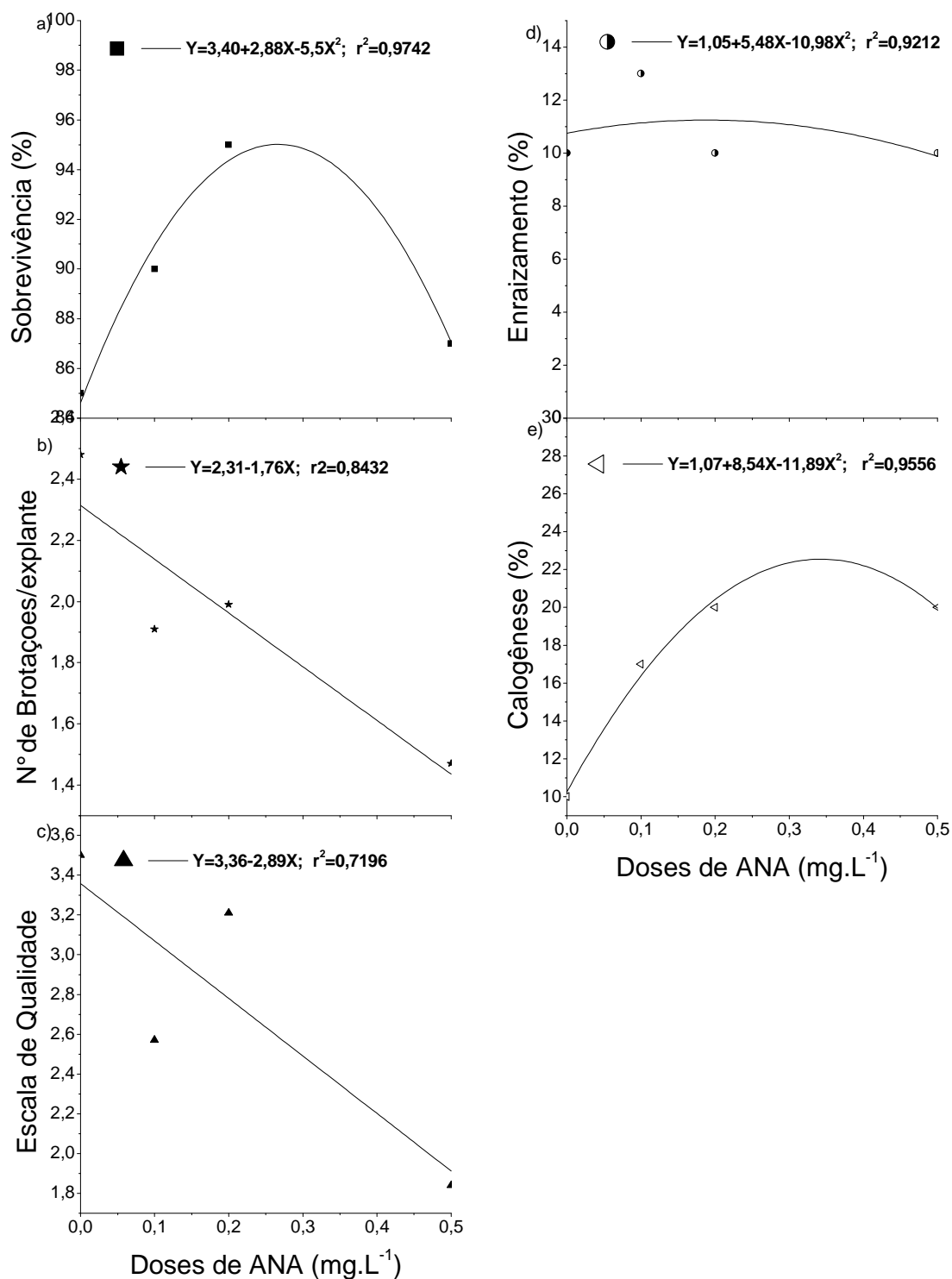


FIGURA 4. a) Percentual de sobrevivência de explantes; b) Número de brotações por explante; c) Escala de qualidade das brotações; d) Percentual de enraizamento e e) Percentual de calogênese de explantes de pitangueira inoculados em meios de cultivo WPM suplementados com doses de ANA. Porto Alegre, 2009.

Nascimento *et al.* (2008) estudando uma outra espécie de *Eugenia*, avaliaram segmentos nodais de uvaieira, na proliferação de brotos e enraizamento. O meio WPM utilizado foi suplementado com diferentes concentrações de BAP variando de 0,0 a 5,0 mg.L⁻¹ e diferentes concentrações de AIB variando de 0,0 a 4,0 mg.L⁻¹. Os melhores resultados de desenvolvimento, proliferação e formação de raízes foram obtidos tanto em 1,0 mg.L⁻¹ de BAP como na mesma concentração de AIB, tendo essa espécie resposta diferente quanto aos fitorreguladores comparada a pitangueira.

O número de brotações por explante, bem como a sua qualidade, tiveram resposta negativamente linear aos tratamentos com ANA, evidenciando o efeito maléfico desse regulador de crescimento para a emissão de brotações adventícias (Figuras 4B e 4C).

Também em louro-pardo (*Cordia trichotoma*) o ANA provocou excesso de calosidade inibindo a multiplicação e o desenvolvimento das brotações (Mantovani *et al.*, 2001). Resultados similares à ação calogênica do ANA também foram observados em goiabeira serrana por Dal Vesco & Guerra (1999).

Na segunda etapa do estudo, os explantes que provinham de meio suplementado com 0,5mg.L⁻¹ANA foram subcultivados para meios acrescidos de 0,2mg.L⁻¹ BAP. Os mesmos apresentaram menor, sobrevivência e brotações por frasco, contudo obteve-se maior enraizamento, distinguindo do restante dos tratamentos (Tabela 14). Não houve diferença entre os tratamentos para a qualidade das brotações geradas nesta segunda etapa (Tabela 14).

TABELA 14. Sobrevivência relativa, número de brotações por frasco, número de raízes por frasco e qualidade das brotações de pitangueira subcultivadas para meios WPM de cultivo suplementados com ANA ou BAP. Porto Alegre, 2009.

Cultivo	Tratamentos Subcultivo	Sobrevivência %	Nº brotações por frasco	Nº raízes por frasco	Qualidade das brotações
Testemunha	0,2mg.L ⁻¹ ANA	100,0 a	4,25 ab	0,25 d	2,98
0,1mg.L ⁻¹ ANA	0,2mg.L ⁻¹ BAP	87,5 a	3,50 ab	2,00 ab	3,32
0,2mg.L ⁻¹ ANA	0,2mg.L ⁻¹ BAP	75,0 ab	3,00 bc	1,50 bc	3,71
0,5mg.L ⁻¹ ANA	0,2mg.L ⁻¹ BAP	43,7 b	1,75 c	2,75 a	3,25
0,1mg.L ⁻¹ BAP	0,2mg.L ⁻¹ ANA	100,0 a	4,50 a	0,25 d	3,68
0,2mg.L ⁻¹ BAP	0,2mg.L ⁻¹ ANA	100,0 a	4,00 ab	0,00 d	4,00
0,5mg.L ⁻¹ BAP	0,2mg.L ⁻¹ ANA	81,2 a	3,25 ab	0,50 cd	3,46
P>F		0,017	0,004	0,0001	0,18
CV %		26,4	25,4	67,4	15,27 (ns)

Médias seguidas de distintas letras, na coluna, diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

Por sua vez ao subcultivar-se plântulas inicialmente multiplicadas em meio WPM com BAP, transferidas para meio acrescido de ANA, observou-se emissão de poucas ou de nenhuma raiz (entre 0,0 e 0,5 raízes por frasco) (Tabela 14, Figura 5b). Da mesma forma, Uematsu *et al.* (1999) ao subcultivarem brotações de pitangueira, propagadas em meio MS suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ BAP, obtiveram sucesso na indução e alongação das raízes ao repicarem o material para meio livre de regulador de crescimento. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o contato prolongado das culturas com altas concentrações de citocinina (BAP), na fase de multiplicação, pode inibir ou atrasar a etapa de enraizamento.

Houve a indução de brotações adventícias, no material que provinha de meio suplementado com 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹ ANA e, foi repicado para meio com BAP (Figura 5a), exibindo 3,5 e 3,0 brotações por frasco, respectivamente (Tabela 14). Este resultado, associado à regeneração de plântulas completas, obtido em meios acrescidos de baixas concentrações de ANA na primeira etapa, pode sugerir que,

iniciar o cultivo *in vitro* de pitangueira pela fase de enraizamento, possa ser mais promissor que iniciar pela fase de multiplicação.

Na aclimatização das plântulas obtidas, em câmara com nebulização intermitente, obteve-se 100% de adaptação, embora não tenha se realizado estudos comparativos com outros métodos (Figura 5c).

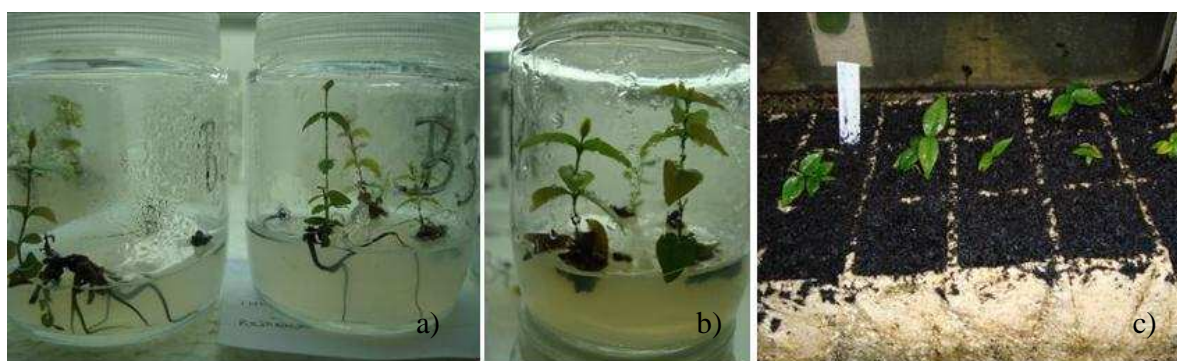


FIGURA 5. a) explantes oriundos de meios suplementados com ANA e subcultivados para meios com BAP; b) explantes oriundos de meios suplementados com BAP e subcultivados para meio com ANA; c) Plântulas micropropagadas na fase de aclimatização *ex vitro*. Porto Alegre, 2009.

4.2 Estudos para propagação vegetativa por miniestaquia de pitangueira

Houve interação entre as variáveis doses de AIB e idade da planta matriz e, doses de AIB e tempo de imersão das estacas, para os fatores: sobrevivência, retenção foliar e emissão de novas folhas (Figura 6). As variáveis que se destacaram para estes fatores foram o tempo de imersão de 0 horas e as estacas de plantas jovens (Figura 6). As estacas de plantas adultas atingiram até 45% de sobrevivência, quando não tratadas com AIB, com acréscimo na mortalidade à medida que aumentou a concentração da auxina (Figura 6a). A maior sobrevivência das estacas (85%) foi observada no tratamento 0 horas de imersão

e 0 mg.L⁻¹ de AIB (Figura 6a). A imersão em água por 24 e 48 horas prejudicou a sobrevivência e desenvolvimento das estacas, sendo que no tratamento 48 horas todas as estacas morreram nas primeiras semanas do experimento.

As estacas de plantas jovens apresentaram maior sobrevivência, ficando entre 42% e 60%, enquanto que sobreviveram entre 0% e 46% das estacas oriundas de plantas adultas (Figura 6a). O baixo percentual de sobrevivência e enraizamento das estacas oriundas de plantas adultas pode ter ocorrido devido a época do ano em que foram coletadas as mesmas, já que no período da coleta a planta apresentava-se em plena floração. Da mesma forma, Sasso (2009) propagando a jaboticabeira Açú (*Myrciaria* sp.) por estacas apicais herbáceas (10 cm) coletadas no término da frutificação, obteve percentagem de enraizamento em torno de 7,1%. O autor justifica dizendo que este fato pode estar relacionado com a menor concentração de reservas da planta-matriz, devido ao estágio que se encontrava a planta matriz no momento da coleta das estacas.

Lopes (2009) estudando a estaquia de diferentes tipos de estacas semi-lenhosas (apical, mediana e basal) das espécies de cerejeira-do-mato (*E. involucrata* D.C.), pitangueira (*E. uniflora* L.) e grumixameira (*E. brasiliensis* Lam), verificou que a sobrevivência das estacas de pitangueira foi afetada negativamente pelas maiores doses de AIB, contudo o percentual de sobrevivência observado foi similar ao deste trabalho, para a dose de 0 mg.L⁻¹ de AIB. Quanto às outras espécies, grumixameira não apresentou efeito significativo à dose de auxina (atingindo cerca de 95% de sobrevivência em estacas apicais) e em cerejeira-do-mato observou uma correlação entre o incremento das doses de

AIB e sobrevivência das estacas, alcançando até 50 % e 55,5 % de sobrevivência para estacas da porção mediana e basal.

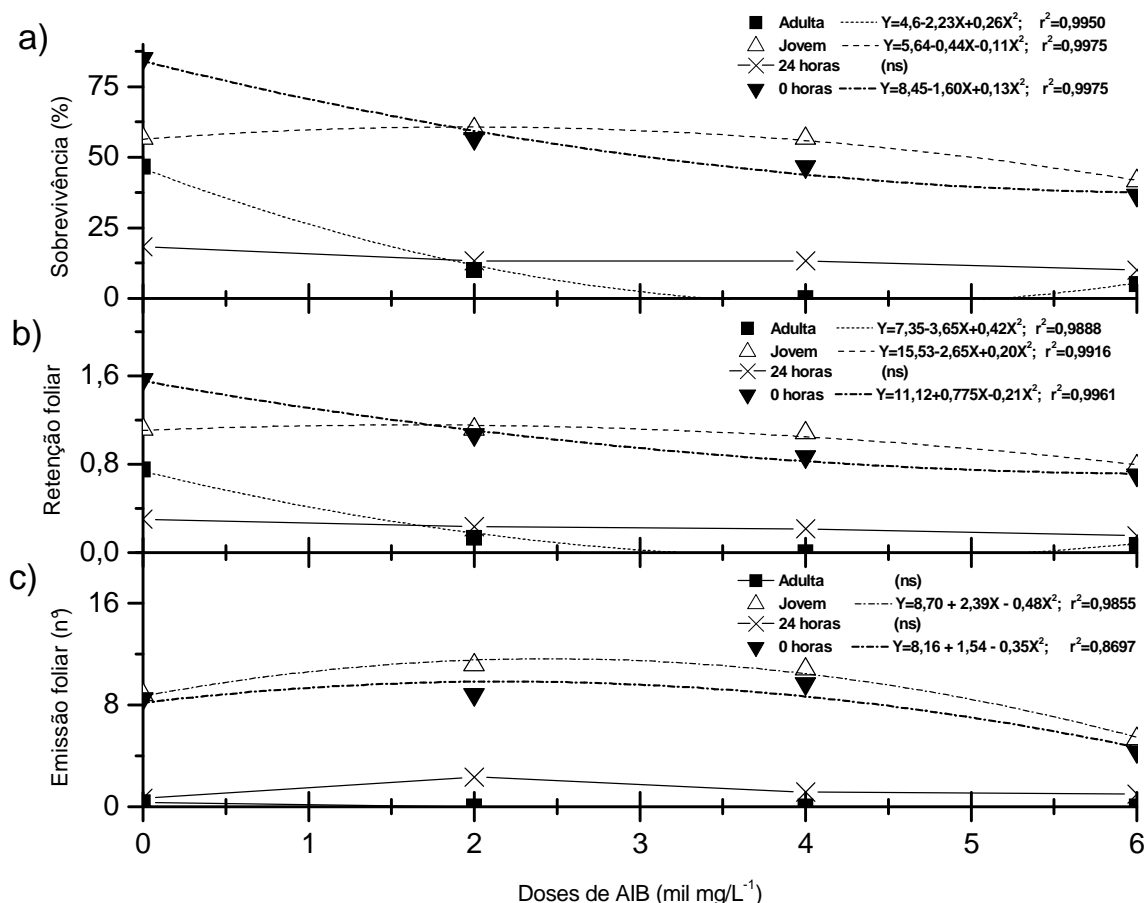


FIGURA 6: a) Percentual de sobrevivência, b) retenção foliar (n° de folhas/estaca) e c) emissão foliar em miniestacas de pitangueira. Porto Alegre, 2009.

A dose de 0 mg.L⁻¹ AIB propiciou a maior retenção de folhas, independentemente da idade da planta matriz e do tempo de imersão, retendo até 1,5 folhas por estaca no tratamento 0 horas de imersão (Figura 6b). No entanto, para a emissão de novas folhas o incremento ocorreu até a dose de 2400mg.L⁻¹ AIB para estacas de plantas jovens e 0 horas de imersão (Figura 6c). Segundo Costa Júnior (2000) a presença de folhas no enraizamento de estacas influencia

no processo de formação radicial, auxiliando no transporte de substâncias promotoras de enraizamento e promovendo a perda de água por transpiração.

Nachtigal *et al.* (1994), trabalhando com enraizamento de estacas herbáceas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine, Myrtaceae), em pleno crescimento vegetativo, obtiveram tendências à fitotoxidez de AIB com aumento das concentrações aumentando a queda das folhas e a morte das estacas. Os autores relacionam este fato com o efeito fitotóxico do AIB, principalmente pela formação de uma camada de abscisão foliar que provoca queda das folhas e posterior morte das estacas.

Assim como no presente estudo, a queda de folhas, também foi verificada em goiabeira-serrana, o que influenciou negativamente na percentagem de sobrevivência de estacas (Franzon *et al.*, 2004). Segundo Pasqual *et al.* (2001), é necessário que haja um balanço hormonal endógeno adequado, especialmente entre auxinas, giberelinas e citocininas, ou seja, equilíbrio entre promotores e inibidores do processo de iniciação radicial. As folhas também são requisitos essenciais para o enraizamento das estacas (Silva, 1998), tendo demonstrado grande participação no processo de enraizamento, por contribuírem com substâncias benéficas ao mesmo (Oliveira, 2000).

Houve interação entre as doses de AIB testadas e a idade da planta matriz, para a calogênese das estacas sobreviventes, sendo os tratamentos estaca de planta adulta e 0 mg.L⁻¹AIB, a combinação que apresentou maior proliferação de calos 34,14% (Tabela 15, Figura 7a). Contudo não houve interação entre os demais fatores. Entre os tempos de imersão, 0 horas foi o que acarretou a maior

calogênese, com média de 7,26%, enquanto o tempo 24 horas apresentou somente 3,39% em média (Tabela 15).

TABELA 15. Calogênese relativa de miniestacas de pitangueira. Porto Alegre, 2009.

Calogênese relativa em estacas (%)								
Idade da planta matriz	Doses de AIB (mg.L ⁻¹)							
	0		2000		4000		6000	
Adulta	34,14	A	0,00	B	0,00	B	0,00	B
Jovem	7,63	B	0,00	B	2,58	B	0,00	B
Idade da planta matriz	Tempo de pré-lavagem (horas)							
	0 h				24 h			
Adulta	9,67				3,16			
Jovem	5,00				0,00			
Média	7,26	A					3,39	B
CV %	33,87							

Médias seguidas de distintas letras maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p > 0,05$). Dados transformados ($\sqrt{x+10}$).

Segundo Hartmann *et al.* (2002), quando as estacas são colocadas em condições de enraizamento, comumente ocorre a formação de calos, os quais são massas irregulares de células parenquimáticas em diferentes estágios de lignificação, através dos quais as raízes emergem. Porém, a formação das raízes adventícias e dos calos é independente e sua ocorrência simultânea se explica pelo fato de ambos envolverem processo de divisão celular, o que pode depender de condições internas e ambientais similares.

O enraizamento ocorreu apenas em estacas de plantas jovens (Figura 7), tendo interagido os fatores idade da planta matriz e tempo de pré-lavagem, sendo estatisticamente superior, com 69,07% de enraizamento, as estacas de planta jovem não submetidas a pré-lavagem (Tabela 16). Entre as doses de AIB estudadas, não houve diferenças significativas, ficando entre 36,09% e 44,15% de enraizamento nas estacas de plantas jovens (Tabela 16).



FIGURA 7. a) Calogênese em estacas de planta matriz adulta, b) estaca emitindo nova brotação, c) estacas de planta adulta, não submetidas à imersão e sem adição de auxina, d) estacas de planta adulta, submetidas à 24 horas de imersão e sem adição de auxina, e) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e sem adição de auxina, f) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e com adição 2000mg.L^{-1} de AIB, g) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e com adição 4000mg.L^{-1} de AIB, h) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e com adição 4000mg.L^{-1} de AIB, i) estacas de planta jovem, não submetidas à imersão e com adição 6000mg.L^{-1} de AIB, j) estacas de planta jovem, submetidas à 24 horas de imersão e sem adição de auxina, l) estacas de planta jovem, submetidas à 24 horas de imersão e com adição 2000mg.L^{-1} de AIB; Porto Alegre, dezembro de 2009.

Para araçazeiro, Nachtigal & Fachinello (1995), observaram resultado diferente ao deste trabalho, já que o aumento de concentrações de AIB proporcionou aumento no percentual de enraizamento, até a concentração de 4000 mg L⁻¹, diminuindo o percentual de enraizamento a partir de 6000 mg L⁻¹ de AIB, para esta espécie. Da mesma forma, em experimento realizado com jabuticabeira (*M. jaboticaba* Berg.), Scarpate *et al.* (2002), observaram aumento nos percentuais de enraizamento à medida que aumentava-se as doses de AIB (20,17%, 33,0%, 35,08%, 11,0% e 22,58% de enraizamento para as doses respectivas de 0, 3000, 6000, 9000 e 12000 mg L⁻¹ AIB), contudo a partir da dose de 6000 mg L⁻¹ o efeito do AIB passou a ser considerado inibitório.

TABELA 16. Enraizamento relativo de miniestacas de pitangueira. Porto Alegre, 2009.

Enraizamento relativo em estacas (%)						
Tratamentos	Doses de AIB (mg.L ⁻¹)				Média	
	0	2000	4000	6000		
Adulta	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	B
Jovem	36,09	44,15	38,79	35,82	38,66	A
Média	14,75	17,67	15,74	14,65		
Tempo de pré-lavagem (horas)						
Idade da planta matriz	0 h		24 h			
Adulta	0,00	Ab	0,00	Ab		
Jovem	69,07	Aa	15,59	Ba		
CV %	33,60					

Médias seguidas de distintas letras maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p > 0,05$). Dados transformados ($\sqrt{x+10}$).

Também com resultado diferente deste estudo, Coutinho *et al.* (1992) e Franzon (2004) com goiabeira-serrana, e Lopes (2009) com cerejeira-do-mato (*E. involucrata* D.C.), pitangueira (*E. uniflora* L.) e grumixameira (*E. brasiliensis* Lam) não obtiveram sucesso no enraizamento de estacas destas espécies. Coutinho *et*

al. (1992) testando tratamentos formados pela combinação de 5000 mg L⁻¹ e diferentes concentrações de polivinilpirrolidona (PVP), um antioxidante, não obtiveram sucesso no enraizamento de estacas de goiabeira-serrana, ocorrendo apenas a formação de calo na base das estacas.

Em dois ensaios com as espécies de cerejeira-do-mato (*E. involucrata* D.C.), pitangueira (*E. uniflora* L.) e grumixameira (*E. brasiliensis* Lam), Lopes (2009) observou a formação de calos nas estacas sobreviventes (média de 90,5% em pitangueira e 85% em grumixameira), independente do tipo e da dose de AIB utilizada, encontrando raiz somente em 6,67% nas estacas de cerejeira-do-mato tratadas com 500 e 1000 mg.L⁻¹ de AIB. Da mesma forma, Franzon *et al.* (2004) observaram em seu estudo com estacas herbáceas de diferentes tamanhos de goiabeira-serrana que o número de estacas com formação de calo não diferiu significativamente entre os diferentes tratamentos testados com concentrações de AIB (0, 2000, 4000, 8000 mg.L⁻¹), além da ausência de enraizamento das mesmas.

Não houve interação entre os fatores doses de AIB e idade e, tempo de pré-lavagem e idade, para a oxidação relativa das estacas (Tabela 17). Contudo a oxidação foi significativamente maior nas estacas de plantas jovens e também naquelas não submetidas à pré-lavagem, com 13,3% e 13,1% respectivamente (Tabela 17).

Quanto ao parâmetro de crescimento das plantas houve resposta quadrática positiva, com incremento até 2900mg.L⁻¹ de AIB, para aquelas estacas coletadas de planta jovem para massa fresca e seca de parte aérea (Figura 8a e 8b). Já para aquelas coletadas de plantas adultas a resposta foi quadrática

negativa, em função da morte do material submetido as doses de 4000mg.L⁻¹ e 6000mg.L⁻¹ de AIB (Figura 8a e 8b). Para as mesmas variáveis o tempo de imersão não foi significativo (Figura (8a e 8b).

TABELA 17. Oxidação relativa de miniestacas de pitangueira. Porto Alegre, 2009.

	Oxidação relativa em estacas (%)			
	Doses de AIB (mg.L ⁻¹)			
	0	2000	4000	6000
Adulta	19,09	0,00	0,00	0,00
Jovem	12,14	11,02	13,53	18,43
CV %	35,84 (ns)			
Idade da planta matriz	Tempo de pré-lavagem (horas)			Média
	0 h	24 h		
Adulta	5,94	1,88	3,8	b
Jovem	21,61	6,93	13,3	a
Média	13,1 A	4,29 B		
CV %	35,84			

Médias seguidas de distintas letras maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p > 0,05$). Dados transformados ($\sqrt{x+10}$).

As doses de AIB utilizadas apresentaram resposta quadrática para a massa seca de raiz e resposta não significativa para a massa fresca das mesmas (Figura 8c).

Na análise do número de folhas e área foliar, as estacas de planta adulta apresentaram resposta quadrática negativa e para o restante dos fatores a resposta foi estatisticamente não significativa.

Marinho *et al.* (2009) estudaram a miniestaquia de goiabeira e observaram que o tamanho da estaca influenciou na brotação da parte aérea, sendo que estacas de menor comprimento, como as utilizadas neste estudo, apresentaram maior massa e tamanho de brotações da parte aérea, dentro do intervalo estudado, entretanto, estacas de maior comprimento do caule resultaram em maior comprimento e massa fresca de raízes.

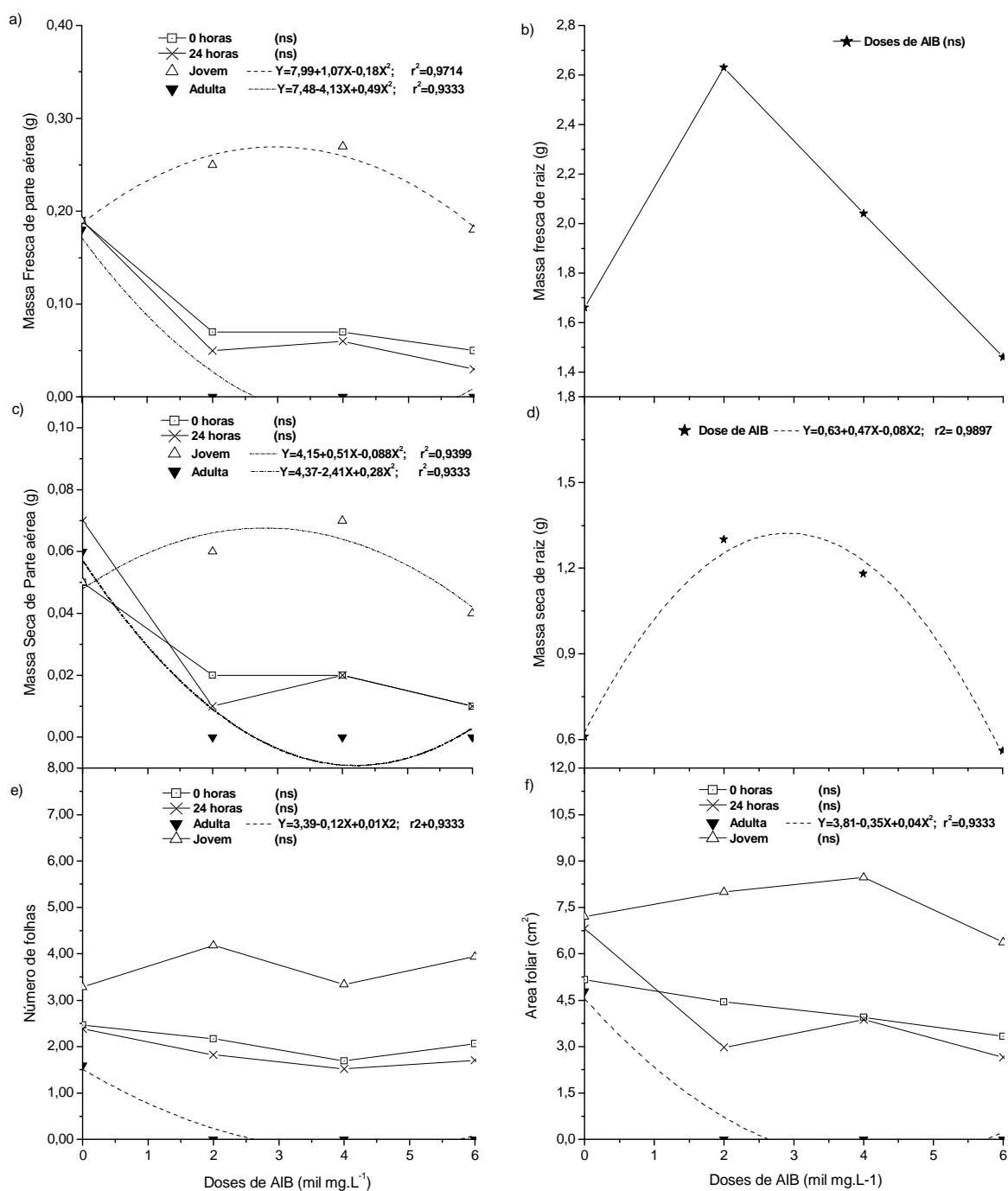


FIGURA 8. a) Massa fresca de parte aérea, b) massa fresca de raiz, c) massa seca de parte aérea, d) massa seca de raiz, e) número de folhas e, f) área foliar de miniestacas de pitangueira. Porto Alegre, 2009.

5 CONCLUSÕES

A multiplicação *in vitro* de pitangueira é possível quando utilizado tratamento com solução bactericida (ácido ascórbico e tetraciclina 60mg) nos explantes, estabelecendo-os inicialmente em meio WPM com $0,2\text{mg.L}^{-1}$ de ANA e subcultivando-os para meio acrescido de $0,2\text{mg.L}^{-1}$ BAP. Ainda, ao iniciar-se o estabelecimento da espécie pela fase de enraizamento ($0,2\text{mg.L}^{-1}$ ANA), pode-se obter a regeneração completa de plântulas. A aclimatização pode ser realizada em câmara de nebulização intermitente.

Para a propagação vegetativa por estaquia da espécie, pode-se utilizar miniestacas oriundas de plantas jovens, sem a necessidade de tratamento com auxina exógena, nem tampouco imersão em água.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pitangueira tem um grande potencial para a exploração econômica, tanto pelo consumo *in natura* de seus frutos, pelo seu potencial fitoterápico, pela utilização de seus óleos essenciais na indústria de cosméticos e também pelo seu valor ornamental. É uma espécie de grande potencial adaptativo a diferentes regiões de cultivo e de grande variabilidade genética. Contudo, é propagada majoritariamente por via sexuada, o que acarreta em desuniformidade dos pomares afetando tanto a quantidade quanto a qualidade de produção de frutos. Ainda, são poucas as informações quanto aos métodos de propagação vegetativa da espécie, dificultando assim a multiplicação desta. Neste contexto os resultados aqui apresentados contribuem para o conhecimento de tais aspectos, embora ainda haja uma série de trabalhos a serem realizados para se atingir o objetivo de propagar a pitangueira satisfatoriamente por via assexuada.

Quanto aos estudos realizados através da micropropagação, observou-se que há a necessidade de dar continuidade a estes quanto aos métodos de desinfestação, meios de cultivo e doses de fitorreguladores visando à melhoria nos percentuais de enraizamento e brotação dos explantes, bem como na redução de explantes oxidados e contaminados.

Já a miniestaquia mostrou ser um método promissor para a multiplicação da espécie, no entanto, ainda é preciso realizá-la em outras épocas do ano, em plantas adultas de genótipos promissores em estágio de crescimento vegetativo.

Além de seguir os testes quanto aos métodos propagativos dessa espécie, ainda é preciso observar, nas mudas produzidas por propagação assexuada, o seu desenvolvimento e a sua adaptabilidade no campo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, V.F.M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.** 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2006.

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

ANDRIGUETO, J.R.; NASSER, L.C.B.; TEIXEIRA, J.M.A. **Produção integrada de frutas: conceito, histórico e a evolução para o Sistema Agropecuário de Produção Integrada – SAPI.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acesso em: 19 ago. 2008.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2008. Panorama. Editora Gazeta, 2007.136p.

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

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

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: guia de identificação & interesse ecológico.** As principais espécies nativas sul-brasileiras. Rio de Janeiro: Instituto Souza Cruz-Clube da Árvore, 2002.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Viçosa : Imprensa Universitária, v.2, 377p, 1984.

BARROSO, G.M.: PERON, M. V. Myrtaceae. In: LIMA, M.P.M. ; GUEDES-BRUNI, R.R. (orgs.). **Aspectos florísticos das espécies vasculares.** Nova Friburgo: Reserva Ecológica de Macaé de Cima, RJ, 1994. v.1, p.261-302.

BENINCASA, M. M. P.; LEITE, I. C. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2004.

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

BEZERRA, J.E.F.; SILVA JUNIOR, J.F.da; LEDERMAN, I.E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 30p. (Série Frutas Nativas, 1).

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

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP : EMBRAPA.CNPQ, 1990. p.37-70,

CALDAS, L.S.; TAKETOMI, C. Desinfestação e controle de oxidação de explantes lenhosos de jaboticabeira e goiabeira para cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, n.1, p.107, jun. 1993.

CHAGAS e SILVA, F.; FONSECA, E.P.; SOARES-SILVA, L.H.; MÜLLER, C.; BIANCHINI, E. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares da bacia do rio Tibagi-3. Fazenda Bom Sucesso, Município de Saponema, PR. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.9, n.2, p.289-302, 1995.

COELHO, M.C.F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth.)**. 1999. 119f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

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

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

COUTINHO, E.F.; MIELLE, M.S.; ROCHA, M.S.; DUARTE, O.R. Enraizamento de estacas semilenhosas de fruteiras nativas da família myrtaceae com o uso de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.13, n.1, p. 167-171, 1991.

COUTINHO, E.F.; KLUGE, R.A.; JORGE, R.O.; et al. Efeito do ácido indolbutírico e antioxidante na formação de calos em estacas semilenhosas de goiabeira serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.3, p.141-143, 1992.

COUVILLON, G.A. Rooting responses to different treatments. **Acta Horticulturae**, Wagennigen, n.227, p.187-196, 1988.

CUNHA, J.F.; PICOLI, E.A.T.; ALFENAS, A.C.; GONÇALVES, R.C. Efeito "in vitro" de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.6, nov./dez 2006

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

DESCHAMPS, C. & PINTO, J.E.B.P. Enraizamento *in vitro* de microestacas e micropropagação de gemas axilares de (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.); **Ciência Rural**, Santa Maria, V.25, n.3, p.389-393, 1995.

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

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

DUARTE, O.R.; MOREIRA, M.A.B.; BENEZAR, R.M.C.; COSTA, M.I. da S.; FREITAS, F.N. de. Efeito do ácido indolbutírico (AIB) em duas épocas, no enraizamento de estacas semilenhosas de acerola (*Malpighia glabra* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2000. CDROM.

DUTRA, L.F.; KERSTEN, E.; FACHINELLO, J.C. Época de coleta, ácidoindolbutírico e triptofano no enraizamento de estacas de pessegueiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.59, n.2, p.327-333, abr/jun, 2002.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Estabelecimento *in vitro* de Mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, Piracicaba, v.6, n.1-2, p.91-96, 2005.

FAO. **Statistical Databases**. 1998. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: abril de 2008.

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

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

FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; CARPANEZZI, A. A.; TAVARES, F. R.; BOEGER, M. R. T.; KOEHLER, H. S. Enraizamento de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. pela aplicação de ácido indol butírico e ácido bórico. **Leandra**, Rio de Janeiro, n.16, p.11-16, 2001.

FERMINO Jr., P.C.P.; NAGAO, E.O.; SCHERWINSKI-PEREIRA., J.E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis.**, Piracicaba, v.37, n.84, p.427-435, dez. 2009

FETT-NETO, A.G.; FETT, J.P.; GOULART, L.W.V.; PASQUALI, G.; TERMIGNONI, R.; FERREIRA, A.G. Distinct effect of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globules*. **Tree Physiology**, Victoria, v.21, p.457-464, 2001.

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 Agrícola**, Piracicaba, v.52, n., p.67-171. 1995.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 8ed. São Paulo : Atheneu, 1989. p.5-8.

FRANZON, R.C. **Caracterização de mirtáceas nativas do Sul do Brasil**. 2004. 114f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

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

GAMBORG, L.; SHYLUCK, J.P. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures In: THORPE, T.O. **Plant tissue culture methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p.21-44.

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

GEORGE, E.F. ; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley : Exegetics, 1984. 709p.

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

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, JR., F.T.; GRENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770p.

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

HOFFMANN, A.; FACHINELLO, J. C.; SANTOS, A. M. Enraizamento de estacas de duas cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.1, n.1, p.7-11, 1995.

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

JOHNSON, L.A.S.;BRIGGS, B.G. Myrtales and Myrtaceae phylogenetic analysis. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, p.700-756, 1984.

KLEIN, R.M. 1984. Importância sociológica das mirtáceas nas florestas rio-grandenses. p. 367-375. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 24., Porto Alegre, 1990. **Anais...** Porto Alegre, 1990.

KERSTEN, E. **Efeito do boro, zinco e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de dois cultivares de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.)**. 1990, 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

KERSTEN, E.; LUCCHESI, A. A.; GUTIERREZ, L. E. Efeitos do boro e zinco no teor de carboidratos solúveis, aminoácidos totais e no enraizamento de estacas de ramos de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n.1, p.13-18, fev/maio, 1993.

LEITÃO FILHO, H.F. **Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão (SP)**. Campinas : Editora da Universidade Estadual de Campinas, 1993.

LEITZKE, L.N.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e frmbeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.31, n.2, p.582-587, 2009.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, L. S. et al. Caracterização físico-química e sensorial de pitanga roxa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.22, n.3, p.382- 85, 2000.

LIMA, V.L.A.G. DE; MÉLO, E.A.; LIMA, D.E.S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v.59, n.3, p.447-450, 2002.

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

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa : Plantarum, 1992. v.1, 352p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa : Plantarum, 1998. v.1, 382p.

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

LUGHADHA, E.N.; PROENÇA, C. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v.83, n.4, p.480-503, 1996.

LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.L.B.; SILVA, C.C.; SHUQUEL, I.T.A.; BASSO, E.A.; VIDOTTI, G.J. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.12, n.2, p. 180-183, 2001.

MANICA, I. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 2: Técnicas de produção e mercado: feijão, figo-da-índia, fruta-pão, jaca, lichia, mangaba**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2002. p.541,

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

MARCHIORI, J.N.C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas – Myrtales**. Santa Maria : Editora da UFSM, 1997.

MARINHO, C.S.; MILHEM, L.M.A.; ALTOÉ, J.A.; BARROSO, D.G.; POMMER, C.V. Propagação da goiabeira por miniestaquia. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.31 n.2, 2009.

MARTINS, A.B.G.; NOGUEIRA, J.A.D.; MATTOS, L.P.B. Fatores que afetam a propagação da aceroleira (*Malpighia glabra* L.) por estaquia herbácea. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2000. CD-ROM.

MAYER, N.A. **Propagação assexuada do porta-enxerto umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) por estacas herbáceas.** 2001. 109f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

McVAUGH, R. The genera of American Myrtaceae, **Interim Report**, Taxon, v. 17, n.8, p.354-418, 1968.

MEDEIROS, C.P.C. **Indução *in vitro* de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.).** 1999. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 1999.

MELO, N.F.; OKASAKI, W.Y.; LEITE, C.B., FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.1, p-102-107, 1999.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 36 e 37, p.5-10, 2000.

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

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.

NACHTIGAL, C. M; HOFFMANN, A.; KLUGE, R. A.; FACHINELLO, J. C.; MAZZINI, A. R. A. Enraizamento de estacas semi-lenhosas de araçazeiro (*Pisidium cattleyanum* Sabine) com o uso do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.1, p.229-235, 1994.

NASCIMENTO, A.C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; PORTO, J.M.; NOGUEIRA, G.; SOARES, F.P. AIB e BAP no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica. Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v.6, n.2, p.223-228, 2008.

NEVES, L.J.; DONATO, A.M. Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Bradea**, Rio de Janeiro, v.5, n.25, p.273-286, 1989.

NEVES, R.C.S; NEVES, I.A.; MORAES, M.M.; GOMES, C.A.; BOTELHO, P.S; JÚNIOR, C.P.A.; CÂMARA, C.A.G. Atividade acaricida do óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. e *Cinnamomum zeylanicul* sobre *Tetranychus urticae*, 32^a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T0418-1.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2010.

OLIVEIRA, M.C.; RIBEIRO, J.F.; RIOS, M.N.S.; REZENDE, M.E. Enraizamento de estacas para a produção de mudas de espécies nativas de matas de galeria. In: RECOMENDAÇÃO Técnica, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2001.

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

OLIVIER, J.J. Initiation of the surinam cherry (*Eugenia uniflora*) in tissue culture. **Inligtingsbulletin Instituut vir Tropiese en Subtropiese Gewasse**, Local de publicação, n.295, p.5-6, 1997.

ONO, E. O. A.; RODRIGES, J. D.; PINHO, S. Z. Ação de auxinas e/ou boro, no processo de formação de raízes em estacas de café (*Coffea arabica* L. CV. "Mundo Novo"). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.37, n.1, p.157-166, 1994.

PAIVA, H.N.; GOMES, J.M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1993. 40p.

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

PEIXOTO, A.L.; GENTRY, A. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, Local de publicação, v.13, p.19-25, 1990..

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

PEROS, J.P.; TORREGROSA, L.; BERGER, G. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation organogenesis and antibiotic sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, 49, p. 171-9, 1998.

PICININI, E.E. Fungicidas benzimidazoles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.357-409, 1994.

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**, Amsterdam, v.21, p.235-40, 1981.

PIERIK, R.L.M. Vegetative propagation. In: IN VITRO culture of higher plants. St. Louis : International Association for Plant Tissue Culture, 1990. p.183-230.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro : Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v.1.

PONTE, E.M.D. **Micropropagação de *Eucalyptus globulus* sp. Globulus Labill.** 1999. 47p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Brasília : Embrapa, 1994.

RADMANN, E.B.; FACHINELLO, J.C.; PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.624-628, 2002.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre : SUDESUL-HBR, 1988.

RODRIGUES, R.R.; NAVE, A.G. Heterogeneidade florística das matas ciliares. In: RODRIGUES, R.R.; LEITÃO FILHO, H.F. (eds.). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo : Edusp : Fapesp, 2000. p. 45-71.

ROTMAN, A.D. Las especies argentinas del género *Eugenia* (Myrtaceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Córdoba, v.31, n.1-2, p.69-93, 1995.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre : Fepam, 1985.

SASSO, S.A.Z. **Propagação vegetativa de jaboticabeira**. 64 f. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, 2009.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: FEPLAM, 1985. 71p.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis a fauna na arborização urbana**. 2 ed. Porto Alegre : Sagra, 1989. 304p.

SHIRIN, F.; SARKAR, A.K. Removal of phenolic exudates from explants of *Tectona grandis*. **Teaknet publication**, Yangon, v.30, p.4-6, 2003.

SILVA, A.L.G.; PINHEIRO, M.C.B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, v.21, n.1, p. 235-247, 2007

SOUZA, C. de; NACHTIGAL, J.C. e KERSTEN, E. Efeito da lesão e do ácido indolbutírico no enraizamento de duas cultivares de ameixeira (*Prunus salicina*,

Lindl) através de estaca. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.1, n.3, p.171-174, 1995.

SOUZA, A. L.; SCHETTINO, S.; JESUS, R.M.; VALE, A.B. Dinâmica da regeneração natural em uma Floresta Ombrófila Densa secundária após corte de cipós, Reserva Natural da Companhia Vale do Rio Doce S. A. Estado Espírito Santo, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.4, p.411-419, 2002.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C. da.; FERRI, J.; SOARES, G.C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, 2007.

SCARPARE FILHO, J.A.; TESSAROLI NETO, J.; COSTA JÚNIOR, H.; et al. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de jaboticabeira 'Sabará' (*Myrciaria jaboticaba*) em condições de nebulização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.146-149, 1999.

SCARPARE, F.V.; KLUGE, R.A.; SCARPARE FILHO, J.A.; et al. Propagação da jaboticabeira 'Sabará' (*Myrciaria jaboticaba* Berg.) através de estacas caulinares. CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., Belém, PA, 2002. **Anais...** [S.l.], 2002. CDROM.

SHIRIN, F.; RANA, P.K.; MANDAL, A.K. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **Journal Forest Research**, Tokyo, v.10, p.465-469, 2005.

SHIRIN, F.; RANA, P.K.; MANDAL, A.K. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **Journal Forest Research**, Tokyo, v.10, p.465-469, 2005.

SILVA, A.L. da; DOAZAN, J.P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée a dès porte-greffe de vigne *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bourdeaux, v.29, n.1, p.1-9, 1995.

SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; ERIQ, A.C.; ANTUNES, L.E.C. Efeito da iluminação e pré-lavagem das brotações de mirtilo cv. florida no estabelecimento *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.127-129, 2007

SILVA, M. O. C. B. da. **Estaquia caulinar de Ateleia glazioveana Bailonm Leguminosae – Papilionoideae**. 2007. 101f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SOARES, G.C.; FERRI, J.; SOUZA, J.A.; SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W. Multiplicação *in vitro* de feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFP, 14.,

Pelotas, 2005. **Anais...** Pelotas, 2005. Disponível em: < http://www.ufpel.edu.br/xivcic/arquivos/CA_00125.rtf > Acesso em: 19 jan. 2010.

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

SOBRAL, M. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo : Editora Unisinos, 2003. (Coleção Fisionomia Gaúcha)

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C.; FERRI, J.; SOARES, G.C.; Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação in vitro de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), **Revista Brasileira Agrociências**, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, 2007.

SOUZA, C. de; NACHTIGAL, J.C. e KERSTEN, E. Efeito da lesão e do ácido indolbutírico no enraizamento de duas cultivares de ameixeira (*Prunus salicina*, Lindl) através de estaca. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.1, n.3, p.171-174. 1995.

SOUZA, P.V.D. de; SCHMITZ, J.A.K.; FREITAS, R.S. de; CARNIEL, E.; CARRENHO, R. Identificação e quantificação de fungos micorrízicos arbusculares autóctones em municípios produtores de citros no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.553-558, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TIWARI, S.K.; TIWARI, K.P.; SIRIL, E.A. An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.1, p.1-6, 2002.

TOFANELLI, M. B. D. **Enraizamento de estacas lenhosas e semilenhosas de cultivares de pessegueiro em diferentes concentrações de ácido indolbutírico**. 1999. 87f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

THORPE, T.A.; PATEL, K.R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v.1, p.49-60.

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

VIANNA, G.R.; COUTO, F. A. A.; OLIVEIRA, A.B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. Arifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, Campinas, v.56, p. 249-54, 1997.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J.E.U.; MÜLLER, C.H.; DIAZ, S.C.; ALMANZA, M. **Frutales Y hortalizas promissórios de la Amazônia**. Tratado de Cooperacion Amazônica. Lima : Secretaria-Pro-tempore, 1996. p.367.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p.4113-4117, 1998.

ZANETTE, F. **Propagação da pereira *Pirus comunis* Var. Garber por estaquia lenhosa**. 1995. 59f. Tese (Mestrado em Fitotecnia e Fitossanitarismo) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

ZONTA, E. P. & MACHADO, A. A. Sanest - Sistema de Análise Estatística, 1984.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of 13 *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. **Plant Growth Regulation**, New York, v.15, p.55-67, 1994.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, p.701-705, 1996.

8 APÊNDICES

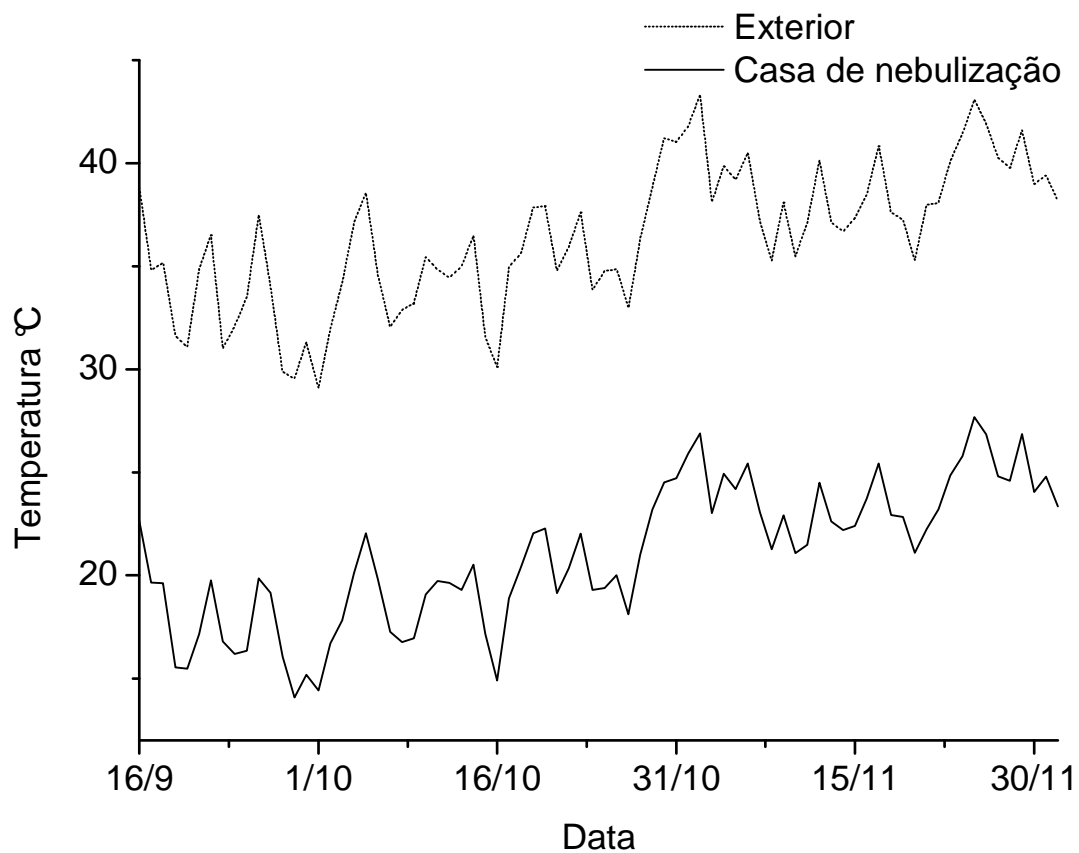
APÊNDICE 1. Identificação e descrição taxonômica das frutíferas nativas coletadas em diferentes locais, no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008*.

Nome Científico	Família	ICN	Nome Popular	Localização (Brasil)	Habitat	Biologia
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	157167	pitangueira	RS, Eldorado do Sul	na estação experimental agrônômica/UFRGS	arbusto denso ± 2 m, folhas verde, ovaladas, flores 4 pétalas brancas, frutos globosos costados, vermelhos
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	157168	pitangueira	RS, Arroio dos Ratos	em residência particular	árvore ± 3 m, folhas verde, ovaladas, flores 4 pétalas brancas, frutos globosos costados, roxo escuro
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	157169	pitangueira	RS, Arroio dos Ratos	em residência particular	árvore ± 3 m, folhas verde, ovaladas, flores 4 pétalas brancas, frutos globosos costados, vermelho
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	157172	pitangueira	RS, POA	em residência particular	árvore ± 1,8 m, folhas verde, ovaladas, flores 4 pétalas brancas, frutos globosos costados, vermelho a alaranjado escuro
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	157173	pitangueira	RS, Eldorado do Sul	na estação experimental agrônômica/UFRGS	árvore ± 2 m, folhas verde, ovaladas, flores 4 pétalas brancas, frutos globosos costados, vermelho

Lopes, 2009

APÊNDICE 2. Composição dos meios de cultivo MS, WPM e DSD1.

Compostos	MS	WPM	DSD1
	-----mg.L ⁻¹ -----		
NH ₄ NO ₃	1650	400	100
KNO ₃	1900	-	1000
K ₂ SO ₄	-	990	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	180
KH ₂ PO ₄	170	170	100
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556	500
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	22,3	1,2
H ₃ B ₀₃	6,2	6,2	1
KI	0,83	-	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,5
Na ₂ .EDTA	37,2	37,2	37,5
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,25	0,025
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	-	-
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025	-	0,025
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	-
Vitaminas			
Tiamina	0,1	1,0	1
Piridoxina	0,5	0,5	1
Ácido Nicotínico	0,5	0,5	1
Glicina	2,0	-	-
Fonte de Carbono			
Sacarose	30 x103	30 x103	20x103
Mio-Inositol	100	100	10
Agente Gelificante			
Ágar-Ágar	6x103	6x103	7x103



APÊNDICE 3. Temperatura média no interior e exterior da casa de nebulização, no período de realização do experimento de estaquia. Porto Alegre, Dezembro de 2009.