

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Tese

Propagação vegetativa e modo de reprodução da
pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

Rodrigo Cezar Franzon

Pelotas, 2008

Rodrigo Cezar Franzon
Engenheiro Agrônomo

Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira
(*Eugenia uniflora* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado).

Orientadora: Ph.D. Maria do Carmo Bassols Raseira

Co-Orientador (es): Dr. Luis Eduardo Corrêa Antunes
Ph.D. Bonifácio Hideyuki Nakasu
Ph.D. Maria Herrero Romero

Pelotas, 2008

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

F837p Franzon, Rodrigo Cezar
Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira
(*Eugenia uniflora* L.) / Rodrigo Cezar Franzon. – Pelotas, 2008.
100f. : il.

Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) –
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de
Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. –
Pelotas, 2008, Maria do Carmo Bassols Raseira, Orientador; Co-
orientador Luis Eduardo Corrêa Antunes.

1. Myrtaceae 2. Enxertia 3. Biologia reprodutiva 4.
Variabilidade 5. AFLP I. Raseira, Maria do Carmo Bassols II.
Título.

CDD 634.4

Aprovada em: 25/04/2008

Banca examinadora:

Ph.D. Maria do Carmo Bassols Raseira (presidente)	Pesquisadora Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.
Ph.D. Arione da Silva Pereira (titular)	Pesquisador Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.
Dr ^a . Caroline Marques Castro (titular)	Pesquisadora Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.
Dr. Idemir Citadin (titular)	Professor Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR.
Dr. Valmor João Bianchi (titular)	Professor Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

*Quero dedicar este trabalho a toda minha família,
especialmente a meus pais, que, apesar da distância,
sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado.*

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, e estiveram presentes durante este período.

No entanto, quero expressar agradecimentos em especial.

Primeiramente, aos meus pais, Ademir e Dulci, por tudo o que me ensinaram na vida, princípios de moral e ética, e força para nunca desistir de alcançar um objetivo. Sou grato por tudo, e por vocês tenho enorme carinho e me orgulho de ser vosso filho.

Silvia, meu carinho por ti aumenta a cada dia. Muito obrigado pelo carinho, compreensão, incentivo, paciência e apoio.

A Dr^a. Maria do Carmo Bassols Raseira, pela orientação, amizade e confiança, pelo incentivo e oportunidades, sempre repassando ensinamentos em todas as etapas da realização deste trabalho, além de exemplo de caráter e profissionalismo.

Ao Dr. Luis Eduardo Corrêa Antunes, sempre incentivando, orientando, principalmente nos trabalhos com propagação vegetativa, e pela grande amizade.

A Dr^a. Maria Herrero Romero, pela acolhida, incentivo, sugestões, e por toda a orientação neste período, principalmente nos trabalhos realizados na Espanha.

A Dr^a. Caroline Marques Castro, por toda a colaboração, paciência e disposição em orientar os trabalhos com marcadores moleculares.

Não poderia deixar de mencionar agradecimento aos amigos Américo Wagner Júnior, Renato Trevisan, Eduardo Alano Vieira e Rafael da Silva Gonçalves, pela grande amizade e auxílio nos trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade da realização do curso, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

A Embrapa Clima Temperado, pela oportunidade em desenvolver a tese em suas dependências, e a todas as pessoas desta unidade que contribuíram para a realização dos trabalhos. Em especial a Maria de Fátima da Silveira e a todo o pessoal do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, também a todos do Laboratório de Biologia Molecular, e ao pessoal do trabalho de campo.

A Estação Experimental de Aula Dei, Zaragoza, Espanha, em especial ao Departamento de Pomología, pela acolhida e pela oportunidade em desenvolver os trabalhos de biologia reprodutiva. Em especial a Reys Lopes e Laura Carrera.

A todos os professores do PPGA e da UFPel em geral, que contribuíram na minha formação.

Em especial agradeço a Deus, São Cristóvão e Santa Catarina de Alexandria.

Resumo

FRANZON, Rodrigo Cezar. **Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. 2008. 100f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética de fruteiras silvestres do mundo. Entretanto, muito pouco se conhece sobre a grande maioria destas espécies. Dentre elas, a pitangueira (*Eugenia uniflora*) é uma das espécies que se destaca com potencial de utilização em cultivos comerciais, principalmente pelas características de seus frutos, de sabor exótico e rico em vitaminas, principalmente vitamina A. Entretanto, algumas medidas são necessárias para que a pitangueira seja introduzida nos sistemas de produção. A oferta de mudas uniformes e de qualidade, trabalhos de melhoramento genético, a difusão de informações que permitam o cultivo desta espécie em escala comercial e de forma economicamente viável, além de estratégias de “marketing”, estão dentre as medidas a serem adotadas. Assim, os objetivos deste trabalho foram: (i) encontrar um método adequado para a propagação vegetativa da espécie; (ii) estudar sobre o modo de reprodução da pitangueira. Para atingir os objetivos, foram realizados diferentes trabalhos. Avaliou-se a eficiência do uso da enxertia de garfagem, em diferentes épocas e porta-enxertos, e o comportamento de diferentes genótipos quanto à percentagem de pegamento quando submetidos à enxertia. Foram realizadas observações gerais sobre a interação pólen-pistilo, avaliando o crescimento do tubo polínico no pistilo da flor, bem como avaliou-se a frutificação efetiva sob diferentes condições. Buscou-se entender como ocorre a polinização nesta espécie, por meio da avaliação da variabilidade em populações de plantas obtidas com autopolinização e polinização livre, usando marcadores moleculares AFLP. A enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, utilizando mini-enxertos, proporcionou os melhores resultados, com índices de pegamento de até 76,3%. Existem diferenças entre genótipos quanto à capacidade de propagação por enxertia, com os índices de pegamento variando entre 40,0% e 87,5%. A uvalheira e o guabijuzeiro não são adequados como porta-enxertos, devendo ser usada a própria pitangueira. Esta espécie não é auto-incompatível, mas necessita de agentes polinizadores para uma melhor frutificação. Os resultados sugerem ser o estigma da flor do tipo seco. A partir do terceiro dia os tubos polínicos chegam ao ovário, sendo que, até atingir este

ponto, o desenvolvimento é normal e sem paradas. Marcadores moleculares AFLP são apropriados para o estudo da variabilidade genética entre e dentro de populações de pitangueira. Foi observado maior polimorfismo de marcadores AFLP em populações de polinização livre. A proporção da variabilidade genética total que reside entre populações é significativa, em parte pelo fato da espécie produzir frutos por autofertilização. A autopolinização leva a um aumento de endogamia e, conseqüentemente, uma maior diferenciação genética entre populações. Com base nos resultados gerais obtidos, sugere-se que: sejam testadas outras épocas para a realização de enxertia; sejam realizados estudos mais aprofundados para elucidar como ocorre a fecundação nesta espécie, principalmente a partir da entrada no ovário; seja aumentada a variabilidade existente no banco ativo de germoplasma da Embrapa Clima Temperado, com a coleta e introdução de novos acessos; sejam estudadas populações naturais. Observações sobre insetos polinizadores e total esclarecimento sobre o modo de reprodução são fundamentais para maiores avanços nos estudos de *E. uniflora*.

Palavras-chave: Myrtaceae. Enxertia. Biologia reprodutiva. Variabilidade. AFLP.

Abstract

FRANZON, Rodrigo Cezar. **Vegetative propagation and reproduction mode of the Suriname cherry (*Eugenia uniflora* L.)**. 2008. 100f. Doctor thesis – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Brazil is one of the main centers of genetic diversity of wild fruit species in the world. However, little is known about the majority of these species. The Suriname cherry (*Eugenia uniflora*) is one of the most important species among them because of the potential to become a commercial crop mainly due to the fruit characteristics, exotic flavor and vitamin content, specially vitamin A. However, some important points are of concern in order to introduce this species in the production system. The availability of uniform good quality plants, breeding programs, and the information transference would allow the cultivation of this species in commercial scale in a profitable way. Marketing strategies are also among the necessary actions to be adopted. Thus, the objectives of this work were: (i) to provide a suitable method for vegetative propagation; (ii) to study the reproduction mode of the Suriname cherry. Several experiments were carried out in order to reach the objectives. The efficiency of grafting at different times and on different rootstocks, as well as the percentage of grafting success with different genotypes were studied. Observations on the interactions of pollen-pistil were observed by evaluation of pollen tube growth. Fruit set was also evaluated under different conditions. The pollination system of this species was studied through evaluation of populations obtained by self-pollination and open-pollination, using AFLP molecular markers. Mini bench grafting gave the best results, with 76.3% scions survival. Genotypes differed in capability of asexual propagation, with survival percentages of 40% and 87.5%. The uvalheira and guabijuzeiro are not suitable as rootstocks, therefore Suriname cherry should be used for this. This species is not self-incompatible, but needs pollinizers for better fruit set. Results indicate that the stigma is of a dry type. Three days after pollination, pollen tubes reach the ovary, and until then, they have a normal development, without stops. AFLP molecular markers are adequate for studying genetic variability within and between Suriname cherry populations. Larger polymorphism of AFLP markers was observed in open pollination populations. The proportion of total genetic variability due to variability between populations is significant, partially because of fruit production by self fertilization. Self pollination leads to an endogamy and consequently to a larger genetic differentiation between populations. Considering the

results, it is suggested that grafting should be tested at different periods of development; more studies should be carried out to better understand the fertilization process in this species, mainly after the pollen tubes enter the ovary; the variability of the Embrapa Clima Temperado germplasm bank should be increased with introduction of new genotypes; natural populations should be studied. Observations about pollinizers and knowledge of the reproduction mode are fundamental for advanced studies about *E. uniflora*.

Key words: Myrtaceae. Grafting. Reproductive biology. Variability. AFLP.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Enxertia da pitangueira realizada durante o inverno na região de Pelotas, RS. A – Início de brotação (momento da retirada dos sacos plásticos). B – Desenvolvimento das brotações. C – Muda formada pronta para o plantio. Fotos: Rodrigo Cezar Franzon. _____ 27
- Figura 2 – Flores e pistilo da flor de pitangueira: (A) – Ramos de planta de pitangueira mostrando floração abundante. (B) – Flor da pitangueira, mostrando estigma acima do nível das anteras; Barra = 0,5cm. (C) – Grãos de pólen hidratados e germinados no estigma da flor, dois dias após a polinização; setas indicam os poros (*colpus*); (*) tubos polínicos emitidos pelo grão de pólen; Barra = 20 μ m. (D) – Secção transversal do estilo da flor de pitangueira, um dia após polinização, mostrando tubos polínicos (seta) crescendo entre células (►) do tecido transmissor; Barra = 25 μ m. (E) – Tubos polínicos no tecido transmissor, mostrando tampões de calosa (setas); Barra = 20 μ m. (F) – Parte superior do pistilo de flor coletada a campo, oriunda de polinização livre, apresentando grande quantidade de tubos polínicos germinados e percorrendo o tecido transmissor; Barra = 50 μ m. Figuras C, D, E e F: Corante *Azul de anilina*. Fotos: Rodrigo Cezar Franzon. 50
- Figura 3 – Crescimento médio dos tubos polínicos no estilo de flores autopolinizadas e de polinização cruzada, em duas plantas de pitangueira (“Pit 5” e “PL 1”), em condições de laboratório, desde o primeiro dia após a polinização até sete dias depois. (▼ = não analisado). Legenda: A.P. = autopolinização; P.C. = polinização cruzada. _____ 51
- Figura 4 – Porcentagem de pistilos de flores de duas plantas de pitangueira (“Pit 5” e “PL 1”), com tubos polínicos na base do estilo, em condições de laboratório, desde o primeiro dia após a polinização até sete dias depois. (▼ = não analisado). Legenda: A.P. = autopolinização; P.C. = polinização cruzada. _____ 51

- Figura 5 – Média do número de tubos polínicos que alcançaram a base do estilo, em flores de duas plantas de pitangueira (“Pit 5” e “PL 1”), em condições de laboratório, desde o primeiro dia após a polinização até sete dias depois. (▼ = não analisado). Legenda: A.P.= autopolinização; P.C. = polinização cruzada. _____ 52
- Figura 6 – Pistilo da flor de pitangueira: A – Estigma de flor virgem, um dia após antese. S: secreção, P: papilas. Corante: *Laranja de acridina*; Barra = 50µm. B – Estigma de flor com um dia após polinização (observam-se papilas desorganizadas e diminuição da secreção). GP: grão de pólen, TP: tubo polínico. Corante: *Laranja de acridina*. Barra = 50µm. C – Estigma de flor virgem, um dia após a antese. S: secreção, P: papilas. Corante: *PAS*. Barra = 50µm. D – Secção transversal do estilo da flor, ±2mm abaixo do estigma, um dia após polinização. E: epiderme, TC: tecido cortical, TT: tecido transmissor. Corante: *PAS+Azul de toluidina*. Barra = 50µm. Fotos: Rodrigo Cezar Franzon. _____ 53
- Figura 7 – Pistilo da flor de pitangueira: A – Secção transversal da base do estilo da flor, quatro dias após polinização. Corante: *Laranja de acridina*. Barra = 50µm. B – Secção transversal do estilo da flor, um dia após polinização, com grãos de amido (setas) ao redor do tecido cortical. Corante: *PAS*. Barra = 50µm. C – Detalhe da parede interior do ovário em pistilo com quatro dias após a polinização, mostrando concentração de grãos de amido (*) nas células. PO: parede do ovário. OV: óvulo. TP: tubo polínico. Corante: *PAS*. Barra = 20µm. D – Detalhe de um óvulo, mostrando uma zona de amido (a) ao redor da nucela. Corante: *PAS*. Barra = 50µm. Fotos: Rodrigo Cezar Franzon. _____ 55
- Figura 8 – Dendrograma representando a similaridade genética entre 74 plantas de pitangueira, a partir de 114 marcadores AFLP, com base no coeficiente de Jaccard, utilizando o método UPGMA. Coeficiente de correlação cofenética ($r=0,96$). Setas indicam as plantas mães (seleções “Pit 52” e “Pit 15”). (a) = indivíduo originado por autopolinização; (L) = indivíduo obtido por polinização livre; (m) = similaridade média entre todos os indivíduos. _____ 75

Lista de Tabelas

- Tabela 1 – Percentagem de brotação e pegamento dos enxertos em pitangueira, utilizando-se dois tipos de enxertia de garfagem no topo, em três épocas durante o inverno no município de Pelotas, RS. _____ 27
- Tabela 2 – Percentagem de brotação e pegamento dos enxertos de diferentes seleções de pitangueira, utilizando-se a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, durante o inverno na região de Pelotas, RS. _____ 28
- Tabela 3 – Percentagem de pegamento dos enxertos de pitangueira, utilizando-se a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, em três diferentes porta-enxertos e em duas épocas, durante o inverno na região de Pelotas, RS. _____ 29
- Tabela 4 – Composição em percentagem (v/v) da série de álcool butírico terciário (TBA) utilizada para desidratação do material antes de sua inclusão em parafina. _____ 44
- Tabela 5 – Processo de desidratação do material fixado para posterior inclusão em parafina. _____ 44
- Tabela 6 – Protocolo para hidratar e desparafinar cortes em parafina. _____ 44
- Tabela 7 – Processo de desidratação do material fixado para posterior inclusão em resina sintética JB4. _____ 45
- Tabela 8 – Composição, uso e aplicação dos diferentes corantes histoquímicos fluorescentes utilizados no trabalho. _____ 46
- Tabela 9 – Composição, uso e aplicação dos diferentes corantes histoquímicos para luz normal (microscópio de rotina) utilizados no trabalho. _____ 46
- Tabela 10 – Frutificação efetiva média em sete plantas de pitangueira, submetidas a diferentes tratamentos de polinização (T1 – ramos ensacados com TNT; T2 – ensacados com tela anti-afídeo; T3 – polinização livre). _ 56

- Tabela 11 – Programa de PCR utilizado para Amplificação seletiva. _____ 71
- Tabela 12 – Pares de *primers* utilizados no estudo, número de locos AFLP amplificados, número (N°.P) e percentagem (%P) de polimorfismo encontrada para cada grupo (Gp52 e Gp15), e N°.P e %P total (avaliando todos os indivíduos juntos). _____ 73
- Tabela 13 – Número total de locos, número de polimorfismos e percentagem de polimorfismo para cada população de pitangueira analisada. _____ 74
- Tabela 14 – Análise da variância molecular (AMOVA) em dois grupos (Gp52 e Gp15) de plantas de pitangueira. Cada grupo é formado por 36 indivíduos, divididos em duas populações. GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrados médios. _____ 77
- Tabela 15 – Resumo da AMOVA. Percentagem da variação total observada entre populações. _____ 79
- Tabela 16 – Resumo do quadro da análise da variância da percentagem de brotação e pegamento de enxertos em pitangueira, utilizando dois tipos de enxertia de garfagem no topo, em três épocas durante o inverno na região de Pelotas, RS. _____ 98
- Tabela 17 – Resumo do quadro da análise da variância da percentagem de pegamento de enxertos de sete diferentes seleções, utilizando-se a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, durante o inverno na região de Pelotas, RS. _____ 99
- Tabela 18 – Resumo do quadro da análise da variância da percentagem¹ de pegamento dos enxertos de pitangueira, utilizando-se a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, em três diferentes porta-enxertos e em duas épocas, durante o inverno na região de Pelotas, RS. _____ 99
- Tabela 19 – Resumo do quadro da análise da variância da percentagem¹ de frutificação em sete plantas de pitangueira, submetidas a diferentes tratamentos de polinização (T1 – ramos ensacados com TNT; T2 – ensacados com tela anti-afídeo; T3 – polinização livre). _____ 100
- Tabela 20 – *Teste t* de comparação de médias. Percentagem de crescimento dos tubos polínicos no estilo das flores de duas plantas de pitangueira (“Pit 5” e “PL 1”), entre um e sete dias após a polinização. _____ 100

Sumário

Resumo _____	6
Abstract _____	8
Lista de Figuras _____	10
Lista de Tabelas _____	12
1 INTRODUÇÃO GERAL _____	16
1.1 A pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i> L.) _____	18
2 CAPÍTULO I – Propagação vegetativa da pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i> L.) através da enxertia de garfagem _____	21
2.1 Introdução _____	21
2.2 Material e métodos _____	23
2.3 Resultados _____	26
2.4 Discussão _____	29
2.5 Conclusões _____	36
3 CAPÍTULO II – Estudos sobre a biologia reprodutiva da pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i> L.) _____	37
3.1 Introdução _____	37
3.2 Material e Métodos _____	41
3.2.1 Estudos histológicos _____	41
3.2.1.1 Material vegetal _____	41
3.2.1.2 Estudo da cinética dos tubos polínicos _____	42
3.2.1.3 Cortes histológicos _____	43
3.2.1.4 Corantes histológicos _____	45
3.2.2 Frutificação efetiva _____	48

3.3 Resultados	48
3.3.1 Cinética dos tubos polínicos	48
3.3.2 Estrutura geral do pistilo	52
3.3.3 Frutificação efetiva	55
3.4 Discussão	56
3.4.1 Cinética dos tubos polínicos	56
3.4.2 Estrutura geral do pistilo e interação pólen-pistilo	57
3.4.3 Frutificação efetiva	61
3.5 Conclusões	63
4 CAPÍTULO III – Marcadores AFLP no estudo da variabilidade genética de populações de pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	64
4.1 Introdução	64
4.2 Material e Métodos	68
4.2.1 Material vegetal	68
4.2.2 Extração do DNA	69
4.2.3 Análises AFLP	69
4.2.3.1 Digestão do DNA	69
4.2.3.2 Ligação dos adaptadores	70
4.2.3.3 Reação de pré-amplificação	70
4.2.3.4 Amplificação final seletiva	70
4.2.3.5 Eletroforese	71
4.2.3.6 Avaliação e análise estatística	71
4.3 Resultados e Discussão	72
4.4 Conclusões	81
CONSIDERAÇÕES GERAIS	82
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICES	98

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética do mundo, onde se destacam as fruteiras silvestres. 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 das mirtáceas é uma das maiores famílias botânicas, agrupando mais de 3000 espécies em aproximadamente 140 gêneros (BEARDSELL et al., 1993; LANDRUM; KAWASAKI, 1997; WILSON et al., 2001), estando distribuída por todo o mundo, principalmente, em países de clima tropical e subtropical (MANICA, 2002). Mesmo com a ocorrência do maior número de espécies de grande valor comercial nestas regiões, algumas espécies desta família também ocorrem em regiões de clima temperado. Muitas Mirtáceas apresentam um elevado valor econômico, como o eucalipto (*Eucalyptus* spp.), utilizado na produção de madeira e na produção de aromatizantes, e a goiabeira (*Psidium guajava*), fruteira nacionalmente apreciada pelas características de seus frutos, que são consumidos *in natura* ou industrializados.

Existem muitas espécies nativas da flora brasileira que também apresentam frutos comestíveis, porém com pequena produção comercial e limitada a determinadas regiões, como é o caso da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (BEZERRA et al, 2000), das jabuticabeiras (*Plinia* spp.) e do camu-camu (*Myrciaria dúbia*) (DONADIO et al., 2002), da feijoa (*Acca sellowiana*) (DUCROQUET et al., 2000), e do araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) (RASEIRA; RASEIRA, 1996), entre outras.

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

O gênero *Eugenia*, com cerca de 1000 espécies, é um dos maiores da família, e está distribuído, principalmente, nas Américas Central e do Sul (MERWE et al., 2005). De acordo com Landrum e Kawasaki (1997), o gênero apresenta-se distribuído desde o México e Caribe, até o Norte da Argentina, com aproximadamente 350 espécies ocorrendo no Brasil. Este gênero está inserido no grupo Myrtoideae, o qual inclui todos os gêneros de espécies de Myrtaceae que apresentam frutos carnosos (LUGHADHA; PROENÇA, 1996), e ao qual pertence *E. uniflora*. Além de *E. uniflora*, outras espécies são conhecidas e cultivadas no mundo, como: *E. brasiliensis* Lam., *Myrciastes pungens*, *E. uvalha* Cambess, *E. jambolana* Lam., e *E. involucrata*, conhecidas como grumixama, guabijú, uvaia, jambolão e cerejeira-do-rio-grande, respectivamente (MANICA, 2002).

A Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS, mantém um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de fruteiras nativas do Sul do Brasil, com o objetivo de preservá-las e estudar seu potencial, para que num futuro próximo possam, possivelmente, ser melhoradas e incorporadas aos sistemas produtivos da região, tornando-se uma nova alternativa também aos consumidores. Dentre as espécies estudadas, a pitangueira, juntamente com o araçazeiro, é a que apresenta maior potencial para cultivo a curto prazo, pois existem trabalhos adiantados de seleção de clones, os quais devem ser testados quanto às possibilidades de serem propagados como cultivares comerciais.

Na Embrapa Clima Temperado já foram selecionados em torno de 150 genótipos de pitangueira. Franzon et al. (2004) relatam que existem clones cujo diâmetro das frutas é superior a 2cm, e que o teor de SST para a maioria das seleções é alto, com valores acima de 12°Brix, atingindo até 17°Brix. Quanto a produtividade, algumas seleções produzem entre 15 e 23 kg.planta⁻¹, o que

representa um potencial para produzir em torno de 20 ton.ha⁻¹, em espaçamento de 5m entre filas e 2m entre plantas.

Da mesma forma, clones com elevado potencial produtivo e boas características agronômicas foram selecionados no estado de Pernambuco, onde trabalhos com a espécie vêm sendo realizados pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA (BEZERRA et al., 1995, 1999, 2004).

Além da possibilidade de exploração para consumo dos frutos *in natura*, estas espécies podem ser exploradas pela agroindústria para sucos e para uso no fabrico de sorvetes, geléias, doces, licores e outros produtos. Algumas espécies nativas também vêm despertando a atenção da indústria farmacêutica, pois as frutas são ricas em vitaminas e em substâncias antioxidantes, dentre outras, como óleos essenciais que podem ser extraídos das folhas e de outras partes da planta.

Estas espécies, hoje desconhecidas do mercado consumidor, podem, a médio e longo prazo, constituírem-se em espécies de importância comercial, principalmente em pequenas propriedades rurais, oportunizando uma renda adicional ao agricultor. Ao mesmo tempo, poderão trazer benefícios para os consumidores, através da diversificação da dieta com base em frutas. Deste modo, há um grande número de espécies com potencial a ser explorado para a inserção em sistemas produtivos.

1.1 A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

A espécie *E. uniflora* L. é originária da região que se estende desde o Brasil Central até o Norte da Argentina, no entanto, por ser espécie de fácil adaptação, sua distribuição se fez ao longo de quase todo o território brasileiro, bem como em várias partes do mundo (SANCHOTENE, 1989; BEZERRA et al., 2000). No Brasil, os centros de diversidade que têm a pitangueira como espécie nativa são o Nordeste/Caatinga, Sul/Sudeste, Brasil Central/Cerrado e Mata Atlântica. O nome comum tem origem indígena, do tupi *pi'tãg*, que significa vermelho, em alusão à cor do fruto (DONADIO et al., 2002).

O número de cromossomos básico da espécie é $n = 11$, sendo esta uma espécie diplóide ($2n = 22$) (COSTA, 2004). Em relação à sua ampla distribuição geográfica e diversidade de ecossistemas, a pitangueira ocorre predominantemente na floresta tropical Atlântica como uma árvore que atinge entre 4m a 5m de altura,

podendo, raramente, alcançar 8m a 12m, ou ainda como um arbusto de 0,70m nas áreas de Restinga (SALGUEIRO et al., 2004). Sanchotene (1989) descreve a pitangueira como uma arvoreta, ou árvore, com altura variando de 3m a 12m, e sistema radicular profundo, formado por uma raiz pivotante. O tronco é tortuoso, com manchas claras acinzentadas, com diâmetro de até 40cm. A copa apresenta forma arredondada, com diâmetro de projeção variando de 3m a 5m, quando em cultivo isolado.

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

As flores são bissexuais, reunidas em fascículos de disposição axilar formados por duas a seis unidades, em pedúnculos que variam de 1cm a 3cm de comprimento. As sépalas são oblongas, com 3mm a 4mm de comprimento. As pétalas, em número de quatro, são livres, pubérulas e brancas. O estilete é filiforme, com aproximadamente 6mm de comprimento, e o estigma é capitado (SANCHOTENE, 1989). O ovário é ínfero, bilocular, e, de acordo com Franzon (2004), o número de óvulos é superior a 30.

Os frutos são bagas globosas, coroadas pelo cálice persistente, com os pólos achatados e dotados de sete a oito sulcos no sentido longitudinal. Quando inicia o processo de maturação, o epicarpo passa de verde para vermelho e deste até quase preto (SANCHOTENE, 1989). Entretanto, algumas plantas apresentam frutos de cor laranja ou vermelha, mesmo quando já atingiram a maturação, normalmente com uma a duas sementes, esporadicamente três a quatro e raramente mais do que isto (ANDERSEN; ANDERSEN, 1988).

Além de serem consumidos *in natura*, os frutos desta espécie são utilizados para o processamento (industrial e doméstico), principalmente para o preparo de polpas e sucos, e também para sorvetes, picolés, doces, licores e ainda fermentados (BEZERRA et al., 2000). Assim, existem boas perspectivas de comercialização para os frutos da pitangueira, principalmente em nichos de mercado ávidos por novidades. Além da possibilidade de exploração para consumo dos frutos *in natura* e pela agroindústria, também vêm despertando o interesse da indústria farmacêutica,

com esforços na busca de substâncias antioxidantes, dentre outras, como antocianos e óleos essenciais que podem ser extraídos das folhas e de outras partes da planta.

O potencial de utilização da pitangueira é ressaltado pelas características de seus frutos, de sabor exótico e rico em vitaminas, principalmente vitamina A. Existem, ainda, grandes perspectivas de crescimento no mercado das misturas entre sucos de frutas de espécies diferentes, principalmente com as de sabor exótico, bem como a possibilidade de ser utilizada como aditivo em bebidas lácteas e nas formas de produtos como refresco em pó e néctar (BEZERRA et al., 2000). Esta espécie, hoje desconhecida do mercado consumidor, pode, a médio e longo prazo, constituir-se numa espécie de importância comercial, principalmente em pequenas propriedades rurais, oportunizando uma renda adicional. Ao mesmo tempo, poderá trazer benefícios para os consumidores, através da diversificação da dieta com base em frutas.

Uma das grandes vantagens do aproveitamento desta espécie em sistemas de produção é a época de colheita. No Sul do Brasil, por exemplo, a primeira safra ocorre em outubro/novembro, e a segunda em março/maio, podendo esta última se estender até a entrada do inverno (FRANZON; RASEIRA, 2004). Neste segundo período, a mão-de-obra nas propriedades rurais e também nas agroindústrias da região, onde a cultura do pessegueiro é uma das principais atividades, está praticamente ociosa, uma vez que já terminou a colheita dessa fruteira e de outras culturas economicamente importantes na região, como a ameixeira, morangueiro, ou que estão aumentando em importância, como amora-preta e mirtilo.

Entretanto, algumas medidas são necessárias para que a pitangueira seja introduzida nos sistemas de produção. A primeira é a oferta de mudas uniformes e de qualidade, o que implica no desenvolvimento de tecnologia para a propagação assexuada de genótipos selecionados. É igualmente importante a implantação de um programa de melhoramento genético e a difusão de informações que permitam o cultivo desta espécie em escala comercial, de forma economicamente viável. Estratégias de “marketing”, destacando aspectos diferenciados, como, por exemplo, aroma e sabor diferenciados, propriedades nutracêuticas, dentre outras, também são importantes no processo. Assim, os objetivos do presente trabalho foram encontrar um método adequado para a propagação vegetativa da pitangueira e estudar o modo de reprodução desta espécie.

2 CAPÍTULO I – Propagação vegetativa da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) através da enxertia de garfagem

2.1 Introdução

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) tem origem na região que se estende desde o Brasil Central até o Norte da Argentina, estando distribuída por quase todo o território brasileiro, e em outras partes do mundo (BEZERRA et al., 2000; DONADIO et al., 2002). Esta espécie, devido às características de seus frutos, de sabor exótico e rico em vitaminas, apresenta grande potencial para exploração econômica. No Brasil, existem áreas de plantio comercial no estado do Pernambuco, onde a importância econômica da espécie vem crescendo e alguns trabalhos com propagação vegetativa vêm sendo conduzidos (BEZERRA et al., 1999, 2002). Estes autores recomendam a utilização da enxertia por garfagem, devido ao menor tempo para a formação da muda. No entanto, a prática da enxertia na pitangueira ainda é pouco conhecida dos viveiristas e produtores daquela região, e os plantios comerciais são realizados exclusivamente com mudas de pé-franco.

Nesta mesma região, genótipos com elevado potencial produtivo e boas características agronômicas vêm sendo selecionados, em trabalhos realizados pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA (BEZERRA et al., 1995, 1999). Os trabalhos de seleção resultaram no lançamento da primeira cultivar brasileira de pitangueira, denominada “Tropicana”, a qual apresenta como principais vantagens a alta produção (20,8kg.ano⁻¹, média de dez anos), peso médio do fruto variando de 3g a 4,5g, polpa avermelhada e relação SST/Acidez de 4,1 (BEZERRA et al., 2004).

No Sul do Brasil, a Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS, vem realizando estudos agronômicos com algumas fruteiras nativas da região, dentre as quais a pitangueira. Esta é uma das espécies estudadas que apresenta, a curto prazo, maior potencial para cultivo na região, pois existem trabalhos adiantados de seleção de clones (FRANZON et al., 2004), que devem ser testados para verificar as possibilidades de serem propagados como cultivares comerciais.

Porém, para maiores avanços, é necessário encontrar alternativas viáveis para a propagação vegetativa da espécie, pois um dos principais problemas encontrados para o início e expansão do cultivo é a produção de mudas. A propagação por sementes apresenta como inconvenientes a grande variabilidade entre as plantas e também na produção, frutificação baixa e mais tardia, baixa qualidade de frutos, entre outros. Por outro lado, a propagação clonal proporciona a formação de pomares uniformes, com populações de plantas homogêneas.

A propagação assexuada, vegetativa, ou clonal, consiste na multiplicação de indivíduos a partir de porções vegetativas das plantas, devido à capacidade de regeneração dos órgãos vegetativos (HARTMANN et al., 1990). Entretanto, para que se tenha sucesso na enxertia, deve-se tomar alguns cuidados, tais como: época adequada de executá-la e características dos ramos a serem utilizados, métodos e técnicas a utilizar, e compatibilidade entre copa e porta-enxerto.

A época de realização e os métodos de enxertia são fatores externos que afetam o sucesso de pegamento dos enxertos. Normalmente, em espécies lenhosas caducifólias, como no caso das fruteiras de clima temperado, os melhores índices de pegamento são obtidos quando a enxertia é realizada no período de repouso vegetativo (HARTMANN et al., 1990; FACHINELLO et al., 2005).

Diferentes métodos de enxertia são conhecidos: a borbulhia, a garfagem e a encostia, existindo ainda variações destes três tipos. No Sul do Brasil, em espécies fruteiras propagadas comercialmente durante o período de repouso vegetativo, normalmente utiliza-se a enxertia de garfagem, a qual é realizada principalmente nos meses de julho e agosto (FACHINELLO et al., 2005). A enxertia de garfagem é citada na literatura para uma série de espécies fruteiras, como: acerola (*Malpighia glabra*) (GONZAGA NETO et al., 1996), mangueira (*Mangifera indica*) e noqueira-macadâmia (*Macadamia integrifolia*) (JACOMINO et al., 2000), abacateiro (*Persea americana*) (JACOMINO et al., 2000; MINDÊLLO NETO et al., 2004), videira (*Vitis vinifera*) (REZENDE; PEREIRA, 2001; ROBERTO et al., 2004), umbuzeiro (*Spondias*

tuberosa) (ARAÚJO; CASTRO NETO, 2002), camu-camu (*Myrciaria dubia*) (SUGUINO et al., 2003), gravioleira (*Annona muricata*) (KITAMURA; LEMOS, 2004), caramboleira (*Averrhoa carambola*) (BASTOS et al., 2005), e para a própria pitangueira (BEZERRA et al., 1999, 2002), dentre outras, ocorrendo variações entre espécies quanto ao tipo de garfagem utilizado.

Cada espécie pode responder de forma diferente ao método de enxertia utilizado, bem como à época de realização da mesma, ocorrendo diferenças até mesmo dentro da mesma estação do ano. Para o Sul do Brasil, não foram encontradas referências ao estudo da propagação vegetativa da pitangueira. Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

- (i) Avaliar a viabilidade da enxertia de garfagem no topo para a propagação vegetativa da pitangueira (*Experimento 1*);
- (ii) Verificar a melhor época para a realização da enxertia da pitangueira durante o inverno no Sul do RS (*Experimento 1*);
- (iii) Avaliar o uso da enxertia de garfagem no topo em fenda cheia na propagação de diferentes genótipos de pitangueira (*Experimento 2*);
- (iv) Testar a viabilidade do uso de diferentes porta-enxertos na propagação vegetativa da pitangueira (*Experimento 3*).

2.2 Material e métodos

Foram realizados três experimentos, com diferentes objetivos, os quais foram conduzidos na Embrapa Clima Temperado, localizada na BR 392, km 78, em Pelotas, RS (31°40'47"S e 52°26'24"W; 60m de altitude). A metodologia utilizada nestes experimentos foi similar, com pequenas variações, descritas a seguir.

Experimento 1:

O experimento foi conduzido no ano de 2005. Os garfos foram coletados de ramos semi-lenhosos oriundos do ciclo de crescimento anterior (setembro de 2004 a maio de 2005), de um clone com características agrônômicas promissoras para ser testado e talvez propagado como cultivar, denominado "Pit 15", mantido na coleção de seleções de pitangueira da Embrapa Clima Temperado. Para a obtenção de um maior número de ramos que pudessem ser utilizados para a coleta de garfos, foi

realizada uma poda drástica em galhos da planta mãe, em setembro de 2004, a fim de estimular a emissão de novas brotações.

Foram utilizados, como porta-enxertos, plantas provenientes de sementes coletadas de plantas de pitangueira, escolhidas ao acaso, na Embrapa Clima Temperado. Estas foram semeadas em sacolas plásticas de coloração preta, medindo 8cm de diâmetro e 15cm de altura, contendo como substrato terra misturada com areia, na proporção 3:1.

Foram realizados dois tipos de enxertia de garfagem, no topo em fenda cheia e em dupla fenda (ou inglês complicado), a uma altura entre 30cm e 40cm do colo da planta. No ponto da enxertia, os porta-enxertos apresentavam, no momento em que foi feita a enxertia, diâmetro médio de 2,0mm, 2,0mm e 2,2mm, respectivamente, em cada época testada.

Foram testadas três datas de enxertia, sendo estas: 06 de julho, 05 de agosto e 13 de setembro de 2005. Este período corresponde ao intervalo entre os dois ciclos anuais de produção das plantas nas condições em que são mantidas na Embrapa Clima Temperado. O primeiro ciclo de floração/frutificação inicia em fevereiro e se estende até maio, enquanto que o segundo ciclo inicia em setembro e se estende até dezembro (FRANZON; RASEIRA, 2004).

O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (tipo de enxertia x época de enxertia), com cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por oito plantas.

Experimento 2:

O experimento foi conduzido no ano de 2006 e foram testados sete genótipos: "Pit 15", "Pit 61", "Pit 74", "Pit 75", "Pit 77", "Pit 137" e "Pit 161", escolhidos de acordo com a disponibilidade de material para a coleta de garfos. Os porta-enxertos utilizados foram obtidos da mesma forma que aqueles descritos no *Experimento 1*, e apresentavam um diâmetro médio de 25mm no ponto da enxertia. A enxertia foi realizada a uma altura entre 30cm e 40cm do colo da planta, no dia 06 de setembro de 2006.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por 10 plantas.

Experimento 3:

O experimento foi conduzido no ano de 2006, e foram testadas três diferentes espécies da família Myrtaceae como porta-enxertos, sendo eles: pitangueira (*E. uniflora*), uvalheira (*E. pyriformis*) e guabijuzeiro (*M. pungens*), os quais apresentavam, respectivamente, 26mm, 24mm e 29mm de diâmetro médio no ponto da enxertia. Foram testadas duas épocas de enxertia, 06 de setembro (de acordo com os resultados obtidos no *Experimento 1*) e 16 de outubro. Os porta-enxertos eram de pé-franco, como nos experimentos anteriores. O genótipo utilizado como copa foi a seleção "Pit 15".

O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (época de enxertia x porta-enxerto), com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por 10 plantas.

Metodologia Geral:

Em todos os trabalhos, os garfos foram coletados pela manhã, de plantas adultas, sendo que a enxertia foi realizada logo após a coleta. Para transporte do material vegetal do campo até o local da enxertia, o mesmo foi mantido em recipiente, com a base dos ramos imersos em água, a fim de evitar desidratação. Nos três experimentos foram utilizados garfos com tamanho aproximado de 5cm de comprimento, com diâmetro o mais próximo possível ao diâmetro do porta-enxerto, e com um par de gemas, nos quais foram mantidas as duas folhas, cada uma delas reduzidas em 50% de sua área foliar. Ressalta-se que mesmo nas condições de inverno da Região Sul do Brasil, as plantas de pitangueira não perdem suas folhas. Também, foram mantidas as folhas existentes no porta-enxerto, abaixo do ponto de enxertia, a fim de manter a atividade fotossintética da planta até que houvesse a união dos tecidos do porta-enxerto e do garfo. Diferentemente, as brotações laterais existentes nesta região foram eliminadas, bem como aquelas que surgiram durante o acompanhamento do experimento.

Os porta-enxertos foram mantidos em condições ambientais, sob telado. No dia da enxertia foram levados para casa de vegetação. Devido ao tipo de material utilizado, ambos (porta-enxerto e garfos) semi-lenhosos e frágeis ao manuseio, com pequeno diâmetro, a enxertia foi realizada com o auxílio de bisturi, pois, para um perfeito contato entre as partes, torna-se necessário um corte uniforme. A amarração foi realizada com fita biodegradável para enxertia.

Após a realização da enxertia, o enxerto (porta-enxerto + garfo) foi coberto com um saco plástico transparente tipo celofane (18cm x 30cm), a fim de formar uma câmara úmida para evitar a desidratação dos tecidos, e nele se fez um corte de 2cm em uma das pontas superiores. O saco plástico foi amarrado a uma distância de 15cm a 20cm abaixo do ponto de enxertia. As plantas foram mantidas em casa de vegetação.

Para os *Experimentos 1 e 2*, foram observadas as percentagens finais de brotação e de pegamento dos enxertos, enquanto que para o *Experimento 3* somente foi avaliado o percentual final de pegamento. Os experimentos foram acompanhados semanalmente e foram considerados brotados aqueles que apresentavam brotações com início de expansão do primeiro par de folhas. Neste momento, também foi feita a retirada dos sacos plásticos. A percentagem final de pegamento dos enxertos foi avaliada entre os 100 e 110 dias após a instalação dos experimentos, considerando-se apenas os enxertos sobreviventes.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) (*Experimentos 1 e 3*) e pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$) (*Experimento 2*). Todas as análises foram realizadas com o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). Os dados obtidos, número de brotação e número de pegamento dos enxertos, foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ antes da análise estatística.

2.3 Resultados

Experimento 1:

Não houve interação estatística significativa (Apêndice A) entre os fatores estudados, tipo de garfagem e época de enxertia, para os parâmetros avaliados. Em relação ao tipo de enxertia realizado, não houve diferenças significativas para os percentuais de brotação. Porém, houve diferenças significativas para os percentuais de pegamento dos enxertos. Os percentuais obtidos com a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia (60,0%) foram maiores do que os obtidos com a dupla fenda (44,2%) (Tabela 1).

Em relação à época de enxertia, houve diferenças significativas tanto para brotação quanto para pegamento dos enxertos, sendo que os melhores resultados

foram obtidos no mês de setembro (Tabela 1). Os percentuais de pegamento foram de 42,5%, 60,0% e 77,5% para a garfagem no topo em fenda cheia, contra 32,5%, 42,5% e 57,5% para a dupla fenda, nos meses de julho, agosto e setembro, respectivamente. A Figura 1A apresenta o início de brotação das gemas, que correspondeu ao momento da retirada do saco plástico. A Figura 1B demonstra o desenvolvimento das mudas ao longo do período de condução do experimento, enquanto que a Figura 1C apresenta uma muda pronta para o plantio à campo.

Tabela 1 – Percentagem de brotação e pegamento dos enxertos em pitangueira, utilizando-se dois tipos de enxertia de garfagem no topo, em três épocas durante o inverno no município de Pelotas, RS.

Época de enxertia	BROTAÇÃO (%)			PEGAMENTO (%)		
	Tipo de enxertia					
	DF ¹	FC ²	MÉDIA*	DF ¹	FC ²	MÉDIA*
06 de julho	35,0	47,5	41,3 b	32,5	42,5	37,5 b
05 de agosto	57,5	65,0	61,3 ab	42,5	60,0	51,3 ab
13 de setembro	70,0	82,5	76,3 a	57,5	77,5	67,5 a
MÉDIA*	54,2 A	65,0 A		44,2 B	60,0 A	
Média geral			59,6			52,1
Coeficiente de variação (%)			18,13			16,93

(¹) DF = enxertia de garfagem em dupla fenda. (²) FC = enxertia de garfagem em fenda cheia.

(*) Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, dentro de cada parâmetro avaliado, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

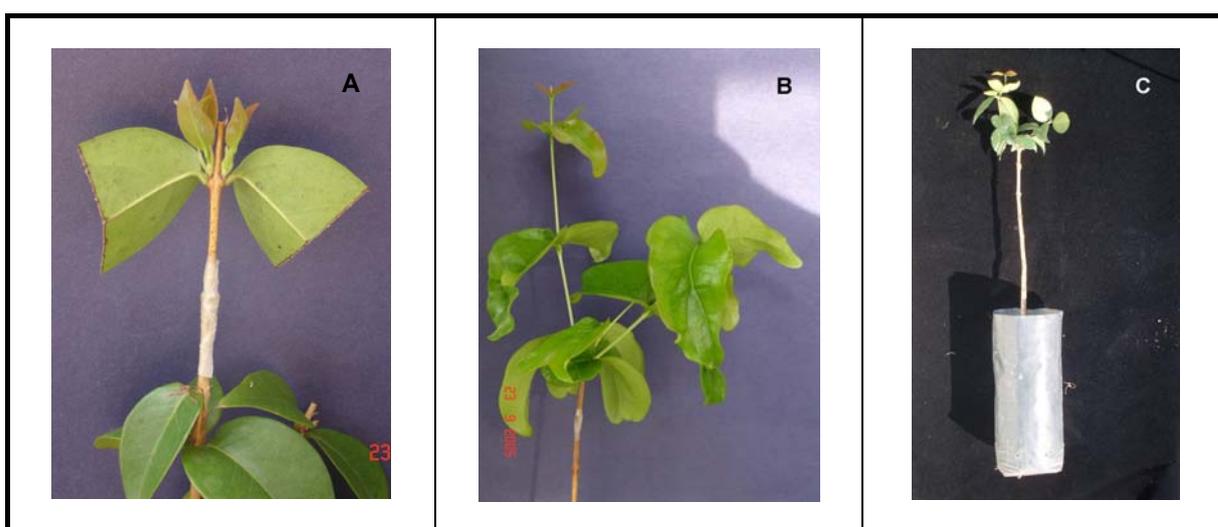


Figura 1 – Enxertia da pitangueira realizada durante o inverno na região de Pelotas, RS. **A** – Início de brotação (momento da retirada dos sacos plásticos). **B** – Desenvolvimento das brotações. **C** – Muda formada pronta para o plantio. Fotos: Rodrigo Cezar Franzon.

Experimento 2:

Houve diferenças estatísticas significativas para os percentuais de brotação e pegamento de enxertos entre as diferentes seleções testadas (Apêndice B). Os percentuais de pegamento de enxertos variaram entre 40,0% e 87,5%. Percentuais acima de 65% foram obtidos para as seleções “Pit 75”, “Pit 61” e “Pit 137”, tanto para brotação quanto para pegamento dos enxertos (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentagem de brotação e pegamento dos enxertos de diferentes seleções de pitangueira, utilizando-se a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, durante o inverno na região de Pelotas, RS.

Seleção	Brotação (%) *	Pegamento (%) *
Pit 75	95,0 a	87,5 a
Pit 61	82,5 a	75,0 a
Pit 137	65,0 a	65,0 a
Pit 74	45,0 b	45,0 b
Pit 77	45,0 b	45,0 b
Pit 15	47,5 b	45,0 b
Pit 161	50,0 b	40,0 b
Média geral	61,43	57,50
Coeficiente de variação (%)	12,06	13,99

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Experimento 3:

Não houve interação significativa entre os fatores estudados, época de enxertia e porta-enxerto (Apêndice C). Os percentuais de pegamento não diferiram entre si nas diferentes épocas testadas. Porém, houve diferenças significativas para pegamento dos enxertos em relação aos porta-enxertos (Tabela 3). O percentual de pegamento dos enxertos em pitangueira e guabijuzeiro não diferiram entre si. Entretanto, estes foram superiores àqueles realizados em uvalheira, onde a percentagem foi praticamente nula.

Em relação à época, não houve diferença significativa entre as duas épocas testadas. Porém, o percentual de pegamento foi ligeiramente maior para a enxertia realizada em setembro, o que está de acordo com os dados obtidos no *Experimento 1*, no qual se observa que a primeira quinzena de setembro foi a mais adequada à enxertia da pitangueira.

Assim como no *Experimento 2* (2006), os índices de pegamento foram menores do que os obtidos no ano de 2005 (até 77,5%), mesmo quando o porta-enxerto utilizado foi *seedling* de pitangueira. Entretanto, o percentual de 42,5% obtido nos enxertos realizados sobre pitangueira e guabijuzeiro, está de acordo com o percentual de 45% obtido para o genótipo “Pit 15” no *Experimento 2*, uma vez que neste experimento também foi utilizado este mesmo genótipo.

Tabela 3 – Percentagem de pegamento dos enxertos de pitangueira, utilizando-se a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, em três diferentes porta-enxertos e em duas épocas, durante o inverno na região de Pelotas, RS.

Fator de variação	Pegamento (%) *
Época de enxertia	
06 de setembro	28,3 ^{NS}
16 de outubro	19,2
Porta-enxerto	
Pitangueira	28,8 a
Uvalheira	1,30 b
Guabijuzeiro	41,3 a
Média geral	23,8
Coeficiente de variação (%)	23,99

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); NS = diferença não significativa.

2.4 Discussão

Os melhores resultados obtidos com a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia (60%), no *Experimento 1*, comparados com aqueles obtidos com a garfagem em dupla fenda (44,2%), sugerem que a enxertia em fenda cheia seja a mais adequada para a pitangueira, pois, além de proporcionar melhores percentagens de pegamento, é a mais prática de executar. Devido ao tipo de material utilizado, porta-enxertos e garfos semi-lenhosos e com diâmetro médio de 0,20cm, os cortes na enxertia do tipo dupla fenda, bem como a amarração, foram mais difíceis de serem realizados. A rapidez na execução proporcionou uma menor exposição dos tecidos ao ambiente, o que reduz a reação de oxidação de compostos fenólicos. Estes compostos, especialmente em espécies da família das Mirtáceas, quando em contato com o ar resultam em oxidação dos tecidos,

dificultando a formação do calo e o processo de cicatrização (FACHINELLO et al., 2005).

O mês de setembro mostrou-se a época mais propícia para a realização da enxertia, com percentual de 67,5% de pegamento. Esta época coincide com a saída do período de inverno e também do período de dormência das plantas, no Sul do Brasil. Assim, este maior percentual pode estar relacionado com o metabolismo das plantas, pois, na saída do período de frio e dormência, elas aumentam a atividade metabólica e circulação de fotoassimilados, fazendo com que haja maior movimentação de reguladores de crescimento, o que pode auxiliar para o maior índice de pegamento. Deste modo, as células da região cambial, que possuem alta capacidade meristemática, e que são as responsáveis pela união entre porta-enxerto e enxerto, devem ter tido seu processo de divisão e multiplicação acelerados. De acordo com Fachinello et al. (2005), a temperatura é um dos principais fatores envolvidos no processo da enxertia e, juntamente com a umidade, podem influenciar na taxa de divisão celular que afeta a formação de novas células, responsáveis pela união entre os tecidos envolvidos.

Com as condições apropriadas de umidade, proporcionada pela câmara úmida formada pelo ensacamento, e temperatura, provavelmente o período para a união entre as partes envolvidas, com a formação de tecidos vasculares, foi mais curto do que nas outras duas épocas (julho e agosto), período em que a temperatura ainda era baixa e as plantas encontravam-se com atividade metabólica menos intensa. Supõe-se que com o encurtamento desse período houve menor probabilidade de morte dos garfos por desidratação, esgotamento de reservas, ou ainda interferência de outros fatores. Segundo Hartmann et al. (1990), a rápida união entre as partes é fundamental para o sucesso da enxertia, pois diminui o período em que o enxerto poderia sofrer desidratação.

Valores próximos aos encontrados no presente trabalho foram obtidos por Bezerra et al. (1999, 2002), que obtiveram, respectivamente, percentuais de 77,5% e 81,5% de pegamento em enxertia de pitangueira, utilizando garfagem no topo.

Um dos fatores importantes do trabalho foi o tipo de material utilizado na enxertia, porta-enxerto e enxerto com diâmetro em torno de 0,2cm a 0,3cm, ou seja, ramos pouco lignificados, porém, não demasiado tenros. Normalmente, na propagação vegetativa, utilizam-se porta-enxertos com diâmetro em torno de 1cm. Porém, é sabido que em plantas lenhosas, à medida que o diâmetro do tronco

umenta, maior é o estado de lignificação do lenho e maior é a dificuldade de cicatrização e união entre enxerto e porta-enxerto. Além disso, especialmente em espécies da família Myrtaceae, a presença de compostos fenólicos que, em contato com o ar, resultam em oxidação dos tecidos, dificulta a formação do calo e o processo de cicatrização (FACHINELLO et al., 2005). Em função disto, muitas vezes são preferidos porta-enxertos mais jovens e com diâmetro reduzido.

Em algumas espécies, como é o caso da gravioleira (KITAMURA; LEMOS, 2004), o uso da enxertia precoce, em porta-enxertos com diâmetro reduzido, é feito também com o objetivo de baixar os custos de produção, em função de volume de substrato, materiais de consumo e do tempo de permanência no viveiro, além da facilidade do manuseio, intercâmbio de germoplasma e redução no custo do transporte. Estes mesmos fatores, além da menor concentração de compostos fenólicos, também podem ser utilizados para justificar o uso de material com diâmetro reduzido na enxertia da pitangueira.

Entretanto, Bezerra et al. (1999) observaram que porta-enxertos muito finos (0,13cm de diâmetro) e de consistência herbácea dificultam a execução da enxertia em pitangueira, resultando em baixos percentuais de pegamento. Neste mesmo trabalho, assim como em trabalhos subseqüentes (BEZERRA et al., 2002), os autores obtiveram os melhores resultados com porta-enxertos e enxertos de diâmetro aproximado de 0,5cm, medidos a 10cm do colo da planta.

Em noqueira-macadâmia, porta-enxertos com menor diâmetro na região do colo (0,5cm) proporcionou melhores resultados em relação à porta-enxertos de maior diâmetro (1,0cm a 1,3cm) (CAMPO-DALL'ORTO et al., 1988). Os autores destacam que, nesta espécie, o uso de material fino e pouco lignificado possibilitou ao enxertador facilidades na escolha do material e na realização dos cortes, resultando em maior rendimento na operação da enxertia e propiciando melhor união das partes envolvidas, o que teria influenciado decisivamente no melhor pegamento.

Assim, fica evidente que o diâmetro ideal, tanto do porta-enxerto quanto do enxerto, é variável entre as espécies, e que material muito herbáceo ou muito lignificado não é o indicado para pitangueira.

As diferenças observadas entre os genótipos quanto ao pegamento dos enxertos, que variou entre 40,0% e 87,5% (*Experimento 2*), pode estar relacionada com diversos aspectos. O mais importante é o fator genético. Outro pode ser a

diferença entre o estágio de desenvolvimento dos garfos entre os diferentes genótipos testados, e também em relação ao porta-enxerto.

Os percentuais de pegamento de enxertos de pitangueira obtidos nos três experimentos são semelhantes aos resultados de Bezerra et al. (2002), com percentuais variando entre 20,0% e 81,5%. Estes autores relatam que, possivelmente, os menores percentuais observados em alguns genótipos sejam decorrentes de problemas de compatibilidade entre as partes, uma vez que ela é função de afinidade fisiológica e anatômica. A primeira diz respeito à região da enxertia, que pode se tornar seletiva, podendo dificultar o transporte de seiva entre as partes. Já, a segunda estaria relacionada com a íntima associação dos tecidos cambiais na formação da conexão, a qual pode ser comprometida quando a copa e o porta-enxerto possuem células diferentes quanto ao tamanho, forma e consistência.

É possível inferir que tenha ocorrido o mesmo no presente trabalho. Um dado que reforça esta possibilidade de problemas de afinidade é o índice de pegamento obtido para o genótipo "Pit 15". Enquanto no ano de 2005 (*Experimento 1*) os percentuais foram de até 77,5%, no ano de 2006 (*Experimento 2*) o percentual de pegamento foi de 45,0%. Isto poderia ser influenciado tanto de diferenças no desenvolvimento dos garfos entre anos, como diferenças no desenvolvimento do porta-enxerto, diminuindo as possibilidades de sucesso na enxertia.

Em gravioleira também foram observadas diferenças entre genótipos quanto ao pegamento do enxerto (KITAMURA et al., 2004). Os autores destacam que a superioridade no índice de pegamento de enxertos da cultivar Gigante das Alagoas poderia ter sido devido à utilização de garfos e borbulhas geneticamente homogêneos, obtidos de plantas propagadas vegetativamente, enquanto que os garfos da cultivar Crioula foram coletados de plantas com alta heterogeneidade genética, originárias de pés francos. Estes autores destacam, ainda, que a semelhança genética entre porta-enxerto e enxerto também pode influenciar, pois, em seu trabalho, a cultivar que apresentou maiores índices de pegamento foi obtida no mesmo processo de seleção do porta-enxerto utilizado, enquanto que a outra cultivar não tem a origem genética definida. Fachinello et al. (2005) reportam que quanto maior for a afinidade entre enxerto e porta-enxerto, maior a probabilidade de sucesso na enxertia.

Em relação aos testes com diferentes porta-enxertos, quando da utilização da uvalheira, que pertence ao gênero *Eugenia*, o percentual de pegamento foi praticamente nulo. O que chama a atenção é a percentagem de pegamento de enxertos quando da utilização do guabijuzeiro, que, mesmo sendo da mesma família botânica da pitangueira (Myrtaceae), trata-se de uma espécie pertencente ao gênero *Myrcianthes*.

No entanto, apesar dos percentuais de pegamento obtidos com o guabijuzeiro como porta-enxerto, o desenvolvimento do enxerto após a retirada do saco plástico foi nitidamente inferior neste último, embora não tenha sido acompanhado com medições. Na saída do inverno do ano seguinte ao da realização da enxertia, enquanto as brotações de enxertos realizados sobre pitangueira apresentavam comprimento em torno de 25cm a 30cm, alguns inclusive maiores do que isto, as brotações de enxertos sobre guabijuzeiro não ultrapassavam 7cm ou 8cm, ocorrendo, inclusive, a morte de 33,3% dos enxertos.

Isto sugere a existência de algum tipo de incompatibilidade, principalmente para uvalheira e, possivelmente, também para o guabijuzeiro. No primeiro caso impedindo a união entre enxerto e porta-enxerto. No segundo, provavelmente por impedimento do transporte de fotoassimilados entre as partes. De acordo com Hartmman et al. (1990), a compatibilidade na enxertia é entendida como aquela em que ocorre a união bem-sucedida e o desenvolvimento satisfatório na composição de uma planta. Quando isto não acontece, tem-se o que chamamos de incompatibilidade. No entanto, novos testes e acompanhamento durante um tempo mais prolongado após a enxertia, inclusive com observações à campo, são necessários para comprovar a compatibilidade do guabijuzeiro como porta-enxerto para a propagação vegetativa da pitangueira.

Para haver compatibilidade, o enxerto e a planta a ser enxertada devem pertencer, preferencialmente, à mesma espécie. Pode-se, entretanto, obter sucesso com duas diferentes espécies. Porém, quanto maior for a afinidade botânica, maior será a possibilidade de pegamento (HARTMANN et al., 1990; FACHINELLO et al., 2005).

Em camu-camu, uma Mirtácea da região Amazônica, fato semelhante ao aqui reportado foi observado por Suguino et al. (2003). Enquanto que enxertos realizados sobre porta-enxertos da mesma espécie desenvolveram normalmente, quando utilizada a pitangueira e a goiabeira como porta-enxertos ocorreu declínio no

número de brotações. Também foi observada ausência de divisão celular no ponto de contato entre os tecidos na região da enxertia, bem como obstrução dos elementos de vaso pelos tilos, indicando que há incompatibilidade do tipo localizada e imediata entre o camu-camu e estas duas espécies. Além disto, este autor também observou a presença de compostos fenólicos, que provocam oxidação dos tecidos e dificultam o processo de cicatrização.

Um fator importante para o sucesso da enxertia em pitangueira, nos trabalhos aqui realizados, parece ter sido o ensacamento dos enxertos, que foi utilizado com o objetivo de criar uma câmara úmida para evitar desidratação dos tecidos, muito embora Bezerra et al. (1999; 2002) também tenham obtido sucesso na enxertia de pitangueira sem o seu uso. De acordo com Hartmann et al. (1990), a proteção do enxerto contra a desidratação após a operação de enxertia requer cuidado especial, principalmente quando se trata de enxertia por garfagem.

O sistema de proteção tradicionalmente utilizado na enxertia por garfagem é o de sacos de polietileno transparente (JACOMINO et al., 2000). Em acerola, a proteção do enxerto com saco plástico aumentou significativamente o pegamento dos enxertos (GONZAGA NETO et al., 1996). Estes autores supõem que o saco plástico, criando uma câmara úmida na região do enxerto, tenha evitado a possibilidade de ressecamento dos tecidos, propiciando maiores condições para o pegamento da enxertia. Sabe-se que em algumas espécies o uso desta proteção contra a desidratação é fundamental. Entretanto, o uso deste apresenta alguma dificuldade no manuseio. Hartmann et al. (1990) relatam outros materiais que também podem ser utilizados para a proteção do enxerto na produção de mudas, tais como a cera aquecida, cera de abelha e óleos. Testes preliminares realizados no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) indicaram que a parafinação de garfos lenhosos é viável para enxertia de videira, ameixeira, caqui, pereira, pessegueiro, nectarineira e quiwi (JACOMINO et al., 2000).

Outros materiais também podem ser utilizados, tais como parafilme e filme de PVC. Em roseiras, excelentes resultados foram obtidos com o uso de parafilme no processo de enxertia (DAVIES JUNIOR et al., 1986). Da mesma forma, em mangueira, abacateiro e nogueira-macadâmia a proteção com parafilme se mostrou eficiente (JACOMINO et al., 2000), sendo que o pegamento de enxertos foi superior em relação ao uso do método tradicional com saco plástico, e também ao filme de PVC, parafina e cera de abelha. Os mesmos autores destacam que o parafilme já é

utilizado comercialmente em alguns viveiros em substituição ao plástico transparente. Em abacateiro, Mindêllo Neto et al. (2004) também observaram aumento do pegamento com o uso de parafilme em substituição ao saco de polietileno.

Assim, é interessante que sejam testados novos materiais para a proteção do enxerto em pitangueira, como os testados acima ou até mesmo o uso de túneis, semelhantes aos utilizados no cultivo do morango, com a finalidade de aumentar a umidade durante o processo de união entre as partes.

Também, vale ressaltar que outros estudos devem ser feitos em relação à época de enxertia, pois, embora os resultados indiquem o mês de setembro como a época mais adequada, alguns estudos com outras espécies nos mostram resultados distintos, possibilitando a propagação em várias épocas do ano. Um exemplo disto é a goiabeira (*Psidium guajava* L.). Gonzaga Neto (1982 *apud* ARAÚJO; CASTRO NETO, 2002) recomenda os meses de agosto e setembro como os mais propícios para a enxertia, enquanto que Gama et al. (1989) obtiveram os melhores resultados no mês de maio.

Em relação aos porta-enxertos, a propagação é feita exclusivamente por sementes, pois não existe um método eficiente de propagação vegetativa para esta espécie. Conforme já mencionado, a variabilidade destes *seedlings* é grande. Na propagação de cultivares para cultivo comercial, isto poderá representar um problema. A propagação vegetativa por estacas pode ser uma solução. Alguns trabalhos com propagação vegetativa de Mirtáceas produtoras de frutos são encontrados na literatura (LEONEL et al., 1991; COUTINHO et al., 1992; DUARTE et al., 1992; FIGUEIREDO et al., 1995; SCARPARE FILHO et al., 1999; FRANZON et al., 2004). Entretanto, os percentuais de enraizamento na estaquia convencional não são nada satisfatórios.

Uma alternativa é o uso de miniestacas, empregada em larga escala para outras espécies, como no eucalipto (WENDLING et al., 2000a; WENDLING et al., 2000b; TITON et al., 2003; FERREIRA et al., 2004). O desenvolvimento desta técnica para esta espécie proporcionou aumento considerável nos percentuais de enraizamento e redução do tempo para formação da muda.

Em ensaios preliminares testou-se a propagação vegetativa da pitangueira por mini-estacas (FRANZON et al., 2007). Os resultados foram promissores, com médias de enraizamento, aos 90 dias, de até 53,0%. Com 150 dias as médias foram

um pouco maiores, alcançando 62,0%. A aplicação de AIB (2000 ppm), em forma de pó na base das mini-estacas, não influenciou no enraizamento, sugerindo que a utilização deste fitormônio não seja necessária. Entretanto, novos estudos se fazem necessários, com o intuito de otimizar a clonagem nesta espécie. A utilização de mini-estacas seria uma alternativa para superar os problemas com a oxidação de compostos fenólicos, um dos problemas na estaquia convencional de espécies das Mirtáceas (FACHINELLO et al., 2005), e que dificulta a formação de raízes. Supõe-se que estacas mais novas e menos lignificadas tenham menores problemas com este fator, e tenham maior capacidade de enraizamento.

Os resultados obtidos no presente trabalho, nas condições de Pelotas, RS, associados aos resultados obtidos por Bezerra et al. (1999, 2002), em Pernambuco, demonstram que a enxertia de garfagem no topo pode ser utilizada pela cadeia produtiva na produção de mudas de pitangueira de alta qualidade. Esta alternativa abre novas perspectivas para os trabalhos com essa fruteira nativa no Sul do país, onde até o momento não há registros de um método adequado de propagação vegetativa. Assim, em breve algumas seleções existentes na Embrapa Clima Temperado poderão ser testadas para serem propagadas como cultivares, proporcionando aos agricultores da região uma nova oportunidade de diversificação da produção e aumento na renda, principalmente na pequena propriedade familiar, forte característica no meio rural da região.

2.5 Conclusões

Nas condições em que foram realizados os trabalhos, conclui-se que:

- A enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, na saída do inverno, mostrou-se como a mais indicada para ser utilizada na propagação vegetativa da pitangueira.
- Existe diferença entre genótipos desta espécie quanto à capacidade de pegamento na enxertia de garfagem no topo em fenda cheia.
- A uvalheira é incompatível para ser utilizada como porta-enxerto na enxertia da pitangueira.

3 CAPÍTULO II – Estudos sobre a biologia reprodutiva da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

3.1 Introdução

O Brasil é o país com maior biodiversidade do planeta, destacando-se muitas fruteiras. No Sul do Brasil são encontradas muitas espécies silvestres da família Myrtaceae, dentre as quais estão aquelas do gênero *Eugenia*. A pitangueira (*E. uniflora*) é uma espécie conhecida popularmente no Brasil. Entretanto, assim como a maioria das espécies nativas, pouco se conhece em relação ao potencial de utilização pelo homem. Da mesma forma, pouco se conhece sobre a sua biologia reprodutiva.

O conhecimento do modo de reprodução de uma espécie torna-se importante sob vários aspectos, como por exemplo, no manejo e preservação de recursos genéticos vegetais (SOUZA, 1996). Também é importante para o melhoramento genético, que é fundamental para maior êxito da utilização de espécies nativas no sistema de produção de frutas. Estudos da interação pólen-pistilo, bem como o conhecimento da maneira e do momento em que ocorre a fecundação, são alguns dos aspectos que devem ser estudados para elucidar o processo reprodutivo.

Nas angiospermas, o gineceu está dividido basicamente em três partes, estigma, estilo e ovário. Embora exista uma grande variação de morfologia floral, o desenvolvimento do tubo polínico no pistilo da flor é um processo altamente preservado na maioria das espécies, germinando no estigma, crescendo através do estilo e entrando no ovário (HERRERO, 2003). As diferentes estruturas que o

gametófito masculino atravessa interação com ele, servindo de apoio nutricional e direcional (HERRERO; HORMAZA, 1996) e, durante a passagem dos tubos polínicos por estas regiões, ocorre uma série de mudanças, tanto na parte masculina (pólen) quanto na parte feminina (pistilo).

A polinização ocorre com a chegada do pólen ao estigma das flores, a qual pode ocorrer por contato direto da antera com o estigma, ou por agentes polinizadores, como o vento (anemofilia), a água (hidrofilia), aves (ornitofilia) e insetos (entomofilia) (JOHRI et al., 2001). Esta última é a forma mais comum em fruteiras, realizada principalmente por abelhas (RODRIGO; HERRERO, 2000).

No estigma, os grãos de pólen encontram um substrato adequado para a germinação (JOHRI et al., 2001). O estigma das flores pode ser classificado em dois tipos: estigmas úmidos, com abundante secreção na superfície, e estigmas secos, aqueles com limitada secreção (WENT; WILLEMSE, 1984). Em estigmas úmidos, um exudato é secretado sobre a superfície estigmática, acima de uma cutícula. Esta secreção, onde o grão de pólen se adere, se hidrata e germina (CHEUNG, 1996), pode ser escalonada e de diferentes constituições (HESLOP-HARRISON, 2000), podendo conter aminoácidos, lipídios, antioxidantes, proteínas, glicoproteínas, fenóis e carboidratos, além de boro e cálcio (WENT; WILLEMSE, 1984; JOHRI et al., 2001).

Os estigmas secos se encontram cobertos por uma cutícula, a qual é recoberta por uma película protéica (WENT; WILLEMSE, 1984), que tem papel no reconhecimento e na germinação do pólen compatível (JOHRI et al., 2001). Neste tipo de estigma, eventos na pré-polinização incluem o desenvolvimento de uma secreção extracuticular que facilita a adesão e hidratação de pólen compatível, bem como o rompimento da cutícula, tornando-a descontínua ou com fissuras, para facilitar a penetração dos tubos polínicos (HESLOP-HARRISON, 2000). O rompimento desta cutícula ocorre com a ativação da cutinase (WENT; WILLEMSE, 1984; JOHRI et al., 2001).

Em Myrtaceae, Heslop-Harrison e Shivana (1977 *apud* LUGHADHA; PROENÇA, 1996), observaram estigmas do tipo seco, com papilas unicelulares, em cinco dentre sete gêneros de Myrtaceae estudados, incluindo *Eugenia*. Estigmas do tipo seco também são citados em seis gêneros de Myrtaceae na região central do Brasil (PROENÇA; GIBSS, 1994). Isto parece representar uma regra em Myrtoideae,

grupo que inclui todos os gêneros de espécies de Myrtaceae que apresentam frutos carnosos (LUGHADHA; PROENÇA, 1996).

Após a hidratação, ocorre a germinação do grão de pólen. O tubo polínico cresce através do estigma em direção ao tecido transmissor do estilo e é dependente destas estruturas. Estas estruturas produzem secreções, que têm função de guiar e nutrir os tubos polínicos durante o seu trajeto até o ovário (RODRIGO; HERRERO, 2000). De acordo com Herrero e Dickinson (1980), o crescimento do tubo polínico, até a chegada ao tecido transmissor é autótrofo, nutrindo-se de suas próprias reservas. A partir da chegada ao tecido transmissor, passa a ser heterótrofo, e dependente das reservas estilares (HERRERO; DICKINSON, 1979).

O estilo pode ser sólido ou com uma cavidade no centro (oco). No primeiro tipo, o tecido transmissor começa no tecido estigmático e atravessa todo o estilo, até a base, e os espaços intercelulares ficam cheios de secreção, por onde os tubos polínicos desenvolvem-se até a entrada do ovário. No segundo tipo, o canal estilar estende-se desde o estigma até a cavidade do ovário, e a secreção das células acumulam-se sobre a superfície das células glandulares que revestem o canal, por onde os tubos polínicos se desenvolvem (JOHRI et al., 2001).

Ao chegar à entrada do ovário, os tubos polínicos podem encontrar uma estrutura especial, denominada obturador, formado pela placenta ou integumentos, que serve para guiar o crescimento do tubo e facilitar a sua entrada pela micrópila (WENT; WILLEMSE, 1984). Em algumas espécies de *Prunus*, os tubos polínicos sofrem uma parada de crescimento no obturador e, num determinado momento, é produzida uma secreção necessária para os tubos polínicos continuarem seu desenvolvimento (HERRERO; ARBELOA, 1989; RODRIGO; HERRERO, 2000).

Enquanto o crescimento no estilo segue um caminho determinado principalmente pela disponibilidade de reservas (HERRERO; DICKINSON, 1979), no ovário o tubo polínico encontra um ambiente diferente e, aparentemente, com um caminho não claramente definido (HERRERO, 2003). Entretanto, para a maioria das espécies, quando chega ao óvulo, o tubo polínico entra pela micrópila, penetra na nucela e atinge o saco embrionário (HERRERO, 2003). Numerosos autores sugerem que o crescimento do tubo polínico é direcionado por um efeito quimiotrópico, produzido por substâncias secretadas pelo óvulo através da micrópila (WENT; WILLEMSE, 1984), porém, isto ainda não está bem esclarecido.

Estudos sobre a biologia reprodutiva de Myrtaceae brasileiras são raros. Existem alguns trabalhos sobre o mecanismo reprodutivo de espécies desta família em diferentes regiões, destacando-se o de Proença e Gibbs (1994), que estudaram oito espécies na região central do Brasil, e o de Maués e Couturier (2002), que estudaram o camu-camu, na Amazônia paraense. Em pitangueira, Silva (2006) estudou sobre a biologia reprodutiva da espécie no sudeste brasileiro, e observações sobre o crescimento do tubo polínico no pistilo da flor desta espécie foram realizadas na região Sul (FRANZON, 2004). Nesta mesma região existem também trabalhos com o araçazeiro (RASEIRA; RASEIRA, 1996)

No entanto, vários estudos sobre mecanismos envolvidos no processo reprodutivo de espécies desta família são encontrados em outros locais, como na Nova Zelândia (SCHMIDT-ADAM; MURRAY, 2002) e na Austrália (SEDGLEY; SMITH, 1989; SEDGLEY et al., 1989; O'BRIEN; CALDER, 1993; O'BRIEN, 1994; O'BRIEN, 1996; POUND et al, 2002; POUND et al., 2003).

O mecanismo reprodutivo de uma espécie é importante para assegurar a perpetuação de seus descendentes e para uma possível colonização de novos *habitats*, além de constituir a base para o desenvolvimento dos processos evolutivos naturais. Em se tratando de espécies exploradas economicamente, a reprodução é fator decisivo para viabilizar a cultura, seja pela produção de frutos ou sementes (SILVA; PINHEIRO, 2007). Da mesma forma, em espécies que apresentam potencial para exploração, é importante quando se pretende inseri-las nos sistemas de produção. Deste modo, pode-se afirmar que estudos sobre biologia floral são de grande importância, seja para a sua preservação no meio natural ou na utilização da espécie para produção em escala comercial.

A pitangueira é, portanto, uma espécie com reconhecido potencial para exploração econômica, mas com pouco conhecimento do seu modo de reprodução. Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

- (i) Conhecer aspectos da biologia reprodutiva de pitangueira;
- (ii) Estudar a interação pólen-pistilo;
- (iii) Verificar a frutificação efetiva de plantas de pitangueira sob diferentes condições de polinização.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Estudos histológicos

As observações foram feitas com flores coletadas de plantas de pitangueira da coleção de fruteiras nativas do Sul do Brasil, na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS.

A avaliação dos pistilos foi realizada no Laboratório de Pomologia, Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza, Espanha, durante o período de agosto de 2006 a janeiro de 2007.

3.2.1.1 Material vegetal

Preparo das flores

Ramos com flores em estágio de balão (pré-antese), de duas plantas (“Pit 5” e “PL 1”), foram coletados em setembro de 2005, levados para laboratório e mantidos em frascos com água, à temperatura ambiente. Logo após a antese, as flores foram marcadas e, a seguir, aplicados três tratamentos: T1 – autopolinização; T2 – polinização cruzada; T3 – flores não polinizadas. Para autopolinização foi utilizado o pólen da própria flor, enquanto que para polinização cruzada cada planta foi polinizada com o pólen da outra planta, ou seja, “Pit 5” x “PL 1” e “PL 1” x “Pit 5”. O pólen foi previamente coletado e armazenado para este fim, conforme metodologia descrita por Franzon et al. (2007).

Flores em pré-antese de uma terceira planta (denominada “PL 2”) foram marcadas a campo, em abril de 2006. Para evitar a chegada de agentes polinizadores, os ramos foram ensacados e, no dia da antese, foram aplicados os mesmos tratamentos descritos acima. Entretanto, neste caso as flores do tratamento T1 (autopolinização) foram polinizadas com pólen coletado da própria flor, de anteras já deiscidas em flores do ramo ensacado. O tratamento de polinização cruzada (T2) foi feito com pólen da “Pit 5”.

Coleta do pólen

Para a obtenção do pólen, flores em pré-antese foram coletadas. Em laboratório, se destacaram as anteras, as quais foram colocadas em bandejas de papel à temperatura ambiente durante 48 a 72 horas, provocando a sua deiscência e

liberação do pólen. O pólen foi coletado em frascos de vidro e colocado em *freezer* a -18°C , até o momento de sua utilização. Em torno de uma semana antes da utilização, o pólen apresentou viabilidade de 32,0% e 43,0% para “PL 1” e “Pit 5”, respectivamente, avaliado por testes de germinação *in vitro*, por meio da metodologia descrita por Franzon et al. (2007). Para o pólen utilizado na autopolinização da “PL 2”, não foi realizado teste de viabilidade.

Coleta dos pistilos

No dia da antese foram aplicados os tratamentos conforme descrito acima. Este foi considerado o dia 0 (zero). A partir deste dia até o sétimo dia após a polinização, foram coletados entre oito e 20 pistilos de cada tratamento, os quais foram fixados e armazenados em uma solução a 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,03 M (SABATINI et al., 1963), e mantidos a 4°C até o momento de sua utilização.

3.2.1.2 Estudo da cinética dos tubos polínicos

Para verificar a germinação e crescimento dos tubos polínicos no estigma e no estilo, foram observadas entre cinco e 10 pistilos de cada tratamento, coletados em laboratório, de flores das plantas “Pit 5” e “PL 1”.

Para avaliação, os pistilos fixados foram lavados três vezes em água destilada, deixando-se por uma hora cada lavagem, e foram então deixados em sulfito sódico a 5% por 18h. Após este período, foram colocados em nova solução de sulfito sódico a 5% e levados para placa de aquecimento onde, após levantar fervura, foram cozidos por três minutos, com a finalidade de amolecer e clarear os tecidos. O material foi montado sobre lâmina mediante esmagamento (*squash*), com uma gota de Azul de anilina a 0,1% em PO_4K_3 0,1N (LINSKENS; ESSER, 1957), com o objetivo de colorir a calose. A calose é um polissacarídeo composto por 1-3 β glucanos, que se deposita na parede do tubo polínico em forma de tampões a diferentes intervalos durante o crescimento dos tubos. O uso de Azul de anilina na coloração do material permite, sob luz ultravioleta (CURRIER, 1957), a observação da calose, a qual, nestas condições, apresenta fluorescência, mostrando-se com uma coloração amarelo esverdeado brilhante, que se destaca dos tecidos do pistilo e permite assim o seguimento dos tubos polínicos em direção ao ovário (RODRIGO;

HERRERO, 2000). Depois de montadas, as preparações foram observadas em microscópio de fluorescência, avaliando-se a porcentagem de crescimento no estilo, sempre em relação à localização do tubo polínico de maior crescimento. Para avaliação, a porcentagem foi estimada visualmente, dividindo-se o pistilo em duas partes iguais (50% cada parte), cada uma destas metades em outras duas partes (25% cada), e assim por diante. Desta forma, estimou-se o crescimento dos tubos polínicos no estilo das flores.

3.2.1.3 Cortes histológicos

Inclusão em parafina

Para cortes histológicos em parafina, três pistilos de cada tratamento, previamente fixados, foram desidratados em uma série de álcool butírico terciário – TBA (TBA 70%, TBA 85%, TBA 95% e TBA 100%) (Tabela 4) e, a seguir, passaram por processo de inclusão em parafina seguindo metodologia descrita por Rodrigo e Herrero (2000) (Tabela 5), modificada de Jensen (1962). Para facilitar a desidratação e posteriormente a infiltração de parafina nos tecidos durante a inclusão, o ovário foi separado do estilo. Para inclusão, os pistilos permaneceram em parafina durante 30 a 40 dias.

Depois de incluído o material, foram realizados os cortes para observação em microscópio. Os cortes em parafina foram feitos com um micrótomo de rotação 1130/Biocut (Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanha). Inicialmente os cortes foram realizados a 10µm e, depois das primeiras observações, a 8µm. Para observação, os cortes em parafina foram montados sobre lâminas, com solução adesiva Haupt (HAUPT, 1930) e água com formol a 3%, e estas colocadas para secar em placa aquecida a 30°C. Para preparação da solução adesiva, foi dissolvido 1g de gelatina pura em 100mL de água destilada a 30°C, acrescentando 2g de cristais de fenol e 15mL de glicerina. A gelatina e a glicerina proporcionam aderência, enquanto que o fenol previne a contaminação por fungos e bactérias e, a água com formol atua como fixador, desnaturando a gelatina e prevenindo a perda de aderência durante tratamentos posteriores (RODRIGO; HERRERO, 2000). Para colorir, os cortes foram desparafinados em histoclear (CellPath, Reino Unido) e hidratados em uma série de álcoois até chegar em água (Tabela 6).

Tabela 4 – Composição em percentagem (v/v) da série de álcool butílico terciário (TBA) utilizada para desidratação do material antes de sua inclusão em parafina.

	H ₂ O (%)	ÁLCOOL METÍLICO (%)	ÁLCOOL ETÍLICO (%)	TBA PURO (%)
TBA 70%	30	50	-	20
TBA 85%	15	50	-	35
TBA 95%	-	45	-	55
TBA 100%	-	-	25	75

Tabela 5 – Processo de desidratação do material fixado para posterior inclusão em parafina.

DIA	SOLUÇÃO	TEMPO (h)	TEMPERATURA
1 – 3	Álcool etílico 70%	72	Ambiente
4	TBA 70%	24	Ambiente
	TBA 85%	1	Ambiente
	TBA 95%	1,5	Ambiente
5	TBA 100%	1,5	Ambiente
	TBA puro I	1,5	30°C
	TBA puro II	1	30°C
	TBA puro III	17,5	30°C
6	TBA + azeite parafinado	24	30°C
7	Material da mistura anterior sobre parafina	24	60°C
8 – 10	Parafina I	6	60°C
	Parafina II	66	60°C
11	Parafina III	*	60°C
Inclusão em bloco			

* Depende do tipo de material que se está trabalhando. Este tempo pode variar de dois a três dias, até 40 dias. Para pitanguera foram necessários entre 30 e 40 dias.

Tabela 6 – Protocolo para hidratar e desparafinar cortes em parafina.

SOLUÇÃO	TEMPO (min)
Histoclear I	5
Histoclear II	5
Histoclear III	5
Histoclear:etanol (1:1)	5
Álcool 100%	2
Álcool 70%	2
Álcool 40%	2
Água destilada	2

Inclusão em resina plástica

Três pistilos de cada tratamento foram desidratados em uma série de álcool etílico (35%, 50%, 70% e 95%) e incluídos em resina sintética JB4 (Polysciences Inc. Warrington, Pensilvânia, Estados Unidos) (Tabela 7). Para facilitar a infiltração da resina, os pistilos foram divididos em suas três partes, estigma, estilo e ovário. O estilo foi ainda dividido pela metade, para facilitar o processo de inclusão em cápsulas e posterior realização dos cortes. Para inclusão, o material permaneceu em resina sintética JB4 por um período de cinco a 15 dias.

Secções com 2 μ m de espessura foram obtidas com navalha de vidro, em micrótomo de rotação 1130/Biocut (Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanha), para posterior observação em microscópio. Cada corte foi montado sobre uma gota de água destilada colocada em uma lâmina coberta com solução de gelatina a 1%, a qual foi deixada secar em placa aquecida a 30°C.

Tabela 7 – Processo de desidratação do material fixado para posterior inclusão em resina sintética JB4.

Dia	Solução	Tempo (h)	Temperatura
1	Álcool 35%	1	Ambiente
	Álcool 50%	1	Ambiente
	Álcool 70%	1	Ambiente
	Álcool 95%	1	Ambiente
	Solução A catalisada (100ml solução A + 1,25g catalisador)	*	4°C
2	Inclusão em cápsulas com resina sintética (25ml solução A catalisada + 1ml solução B)	-	Ambiente

* Depende do tipo de material que se está trabalhando (\geq 24 horas, podendo ser de até vários dias). Para pitangueira, foram necessários entre cinco e 15 dias.

3.2.1.4 Corantes histológicos

As Tabelas 8 e 9 apresentam, de forma resumida, a composição, uso e aplicação dos diferentes corantes que foram utilizados para observação com luz fluorescente e luz normal, respectivamente.

Tabela 8 – Composição, uso e aplicação dos diferentes corantes histoquímicos fluorescentes utilizados no trabalho.

Corante	Uso colore; (cor)	Aplicação	Composição
Azul de anilina	- Calose; - (amarelo esverdeado)	Tubos polínicos e viabilidade de óvulos	Azul de anilina 0,1% (v/v) em PO ₄ K 0,1N
Auramina O	- Cutina e suberina; - (amarelo)	Cutícula (ceras e lipídios)	Auramina O 0,01% (m/v) em tampão fosfato 0,05M
Calcoflúor	- Celulose; - (azul brilhante)	Paredes celulares	Calcoflúor 0,07% (m/v) em água destilada
Laranja de acridina	- DNA e RNA; - (verde e laranja)	Atividade celular	Laranja de acridina 0,01% (m/v) em tampão fosfato 0,03M

Fonte: RODRIGO; HERRERO, 2000.

Tabela 9 – Composição, uso e aplicação dos diferentes corantes histoquímicos para luz normal (microscópio de rotina) utilizados no trabalho.

Corante	Uso: Colore; (cor)	Aplicação	Composição
Azul de toluidina	- Não específico; - (metacromacia)	Estrutura geral	Azul de toluidina a 0,05% (m/v) em tampão acetato pH=4,4
PAS	- Carboidratos insolúveis; - (vermelho e rosa)	Reservas e estrutura	- Ácido periódico a 0,5%; - Reativo de Schiff
PAS + Azul de toluidina	- Não específico	Estrutura geral e reservas	- Ácido periódico a 0,5%; - Reativo de Schiff; - Azul de toluidina a 0,05% (m/v) em tampão acetato pH=4,4

Fonte: RODRIGO; HERRERO, 2000.

Para aplicação dos corantes, procede-se da seguinte maneira:

Corantes para luz fluorescente:

- Azul de anilina: coloca-se uma gota do corante sobre a secção desejada, cobre-se com lamínula e a observação é feita a partir de 15min após a aplicação;
- Auramina O: coloca-se uma gota sobre a secção desejada e, após 30s retira-se o corante e faz-se uma lavagem rápida com água destilada;
- Calcoflúor: coloca-se uma gota sobre a secção seleccionada e, após 1min retira-se o corante e coloca-se uma gota de água destilada, deixando por 5min;

- Laranja de acridina: coloca-se uma gota sobre a secção selecionada e, após 1min retira-se o corante e lava-se com água destilada por duas vezes de 5min cada.

Quando se utiliza Auramina O, Calcoflúor ou Laranja de acridina, após a lavagem os cortes dos pistilos são deixados secar ao ar livre. Depois de secos, os cortes estão prontos para serem observados em microscópio.

Corantes para luz normal (microscópio de rotina):

- PAS: coloca-se uma gota de ácido periódico a 0,5% sobre a secção desejada, deixando por 1h30min. Após este período os cortes são lavados com água destilada por três vezes, de 3min cada. Em seguida coloca-se uma gota de Reativo de Schiff e deixa-se mais 1h30min no escuro. Passado este tempo, lava-se com água destilada por três vezes de 3min cada.
- Azul de toluidina: coloca-se uma gota do corante na secção desejada e, após 90s lava-se com água destilada.
- PAS + Azul de toluidina: realiza-se a coloração com PAS e, com o corte seco faz-se a coloração com Azul de toluidina.

A lavagem dos cortes com água destilada é feita colocando-se uma gota sobre o corte e retirando-se a mesma com papel absorvente, tomando o cuidado para não danificar a secção de material em estudo. Depois de secos, os cortes estão prontos para serem observados em microscópio. Para os corantes para luz normal, após coloração e secagem dos cortes, foram montadas lâminas permanentes, utilizando-se meio para montagem para preparações permanentes (Eukitt) para fixar a lamínula.

As observações foram realizadas em microscópio de fluorescência Leica DM2500, com luz incidente para luz ultravioleta. Para o corante Azul de anilina, utilizou-se um filtro A (filtro excitador BP 340-380, filtro bloqueador LP 425). Para os corantes Laranja de acridina e Auramina O utilizou-se um filtro I3 (filtro excitador BP 450-490, filtro bloqueador LP 515), e para Calcoflúor um filtro D (filtro excitador BP 355-425, filtro bloqueador LP 470). Fotografias foram realizadas com câmara digital Leica DC-150 conectada ao microscópio.

3.2.2 Frutificação efetiva

Para avaliar a frutificação efetiva, foram selecionadas sete plantas no pomar da Embrapa Clima Temperado, entre fevereiro e março de 2006, e em cada planta foram marcados, ao acaso, nove ramos, nos quais foram aplicados diferentes tratamentos: T1 – ramos ensacados com TNT (tecido não tecido), para evitar a polinização por insetos e por vento; T2 – ramos ensacados com tela anti-afídeo, para evitar a polinização por insetos; e T3 – ramos sem ensacar, para observar a frutificação em polinização aberta. Em cada ramo foi contado o total de gemas florais e, em torno de 30 dias após a antese, o número de frutos formados, obtendo-se, por regra de três simples, a percentagem de frutificação efetiva.

O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 3 (planta x tratamento), com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000). A percentagem de frutificação foi transformada para (*arco seno* $\sqrt{x/100}$) antes da análise estatística.

3.3 Resultados

3.3.1 Cinética dos tubos polínicos

O crescimento dos tubos polínicos no estilo das flores não diferiu entre os tratamentos autopolinização e polinização cruzada, pois o padrão deste crescimento foi muito semelhante. Também não houve grandes diferenças entre plantas. Não foram observados grãos de pólen ou tubos polínicos no estigma e estilo das flores não polinizadas.

Os grãos de pólen, ao chegarem ao estigma, estão desidratados. Uma vez em contato com o estigma, imediatamente começam a se hidratar, podendo-se visualizar os poros (*colpus*) (Figura 2C). O tubo polínico é emitido através de um dos poros, atravessa o estigma, por entre as papilas estigmáticas, e se desenvolve intercelularmente através do tecido transmissor (Figura 2D), até alcançar o ovário. À medida que os tubos polínicos avançam através do tecido transmissor, deixam atrás restos não funcionais, que são isolados do extremo do tubo por tampões de calose (Figura 2E). Em pistilos coletados a campo, de polinização livre, foi observado um

grande número de tubos polínicos germinando no estigma e percorrendo o tecido transmissor (Figura 2F).

A Figura 1A apresenta ramos de uma planta de pitangueira com floração abundante, enquanto que a Figura 2B apresenta detalhe de uma flor, onde se observa o estigma acima do nível das anteras.

Nas primeiras 24 horas após a polinização, o pólen de pitangueira germinou e os tubos polínicos atravessaram a região do estigma, iniciando seu desenvolvimento através do tecido transmissor. Passadas 48 horas, os tubos polínicos alcançaram, em média, 28,0% do comprimento do estilo, e, no terceiro dia, 89,0% (Figura 3). Os tubos polínicos chegam à base do estilo a partir do terceiro dia após a polinização. A Figura 3 representa graficamente o crescimento dos tubos polínicos ao longo do estilo, para cada tratamento, em cada planta, bem como a média de crescimento dos tubos em cada dia após a polinização (esta média representa a curva de crescimento dos tubos polínicos no estilo de flores de pitangueira).

O desenvolvimento dos tubos polínicos é rápido. Após 24 horas, 100% dos pistilos avaliados apresentavam tubos polínicos entre o estigma e 5,0% do estilo. No segundo dia, 75,0% dos pistilos, em média, continham tubos polínicos percorrendo mais do que 20,0% do estilo (Figura 3), e, no terceiro dia, 78,0%, em média, apresentavam tubos na base do estilo (Figura 4). A partir do terceiro dia, este percentual sempre foi superior a 80,0%.

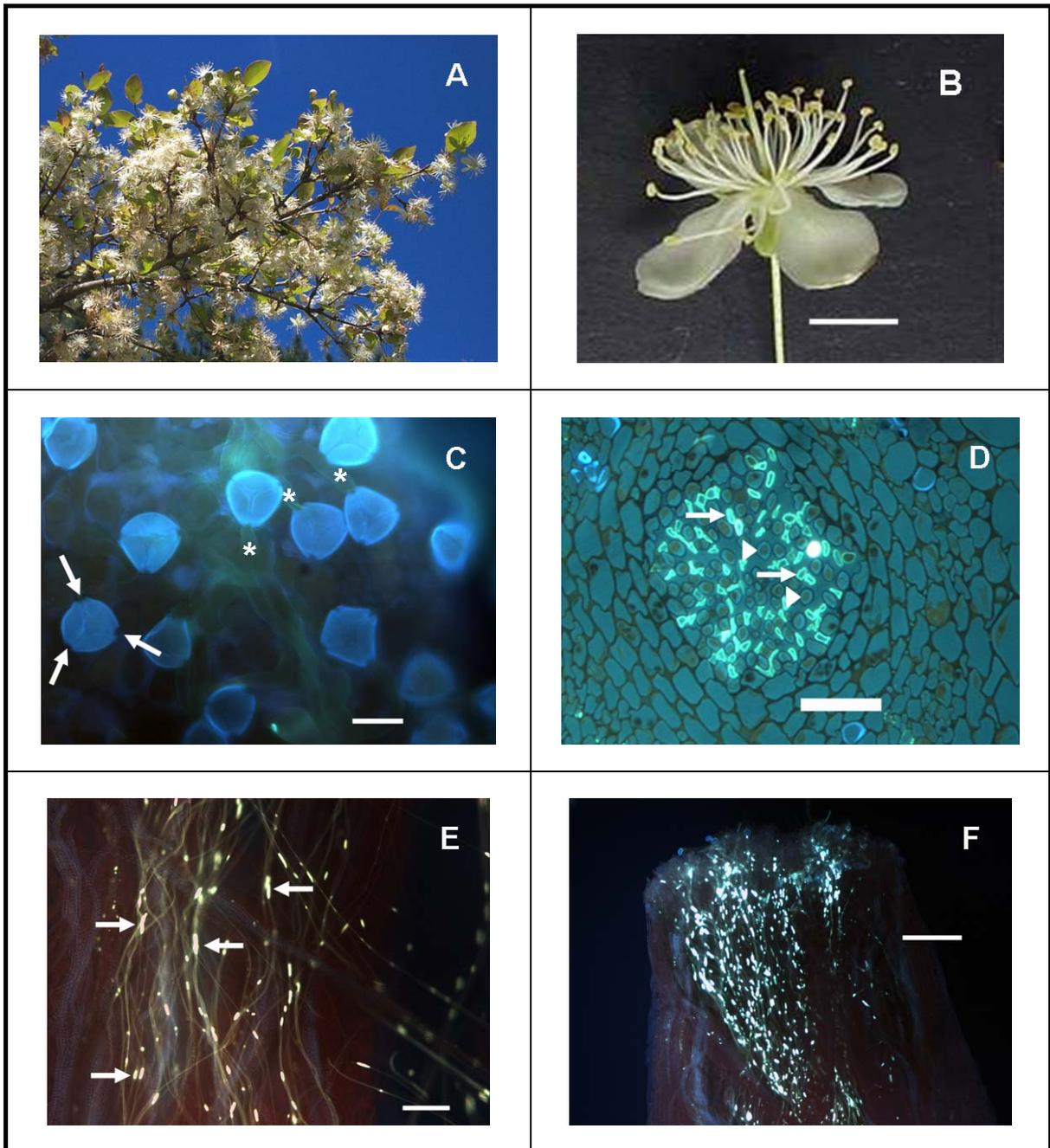


Figura 2 – Flores e pistilo da flor de pitangueira: **(A)** – Ramos de planta de pitangueira mostrando floração abundante. **(B)** – Flor da pitangueira, mostrando estigma acima do nível das anteras; Barra = 0,5cm. **(C)** – Grãos de pólen hidratados e germinados no estigma da flor, dois dias após a polinização; setas indicam os poros (*colpus*); (*) tubos polínicos emitidos pelo grão de pólen; Barra = 20 μ m. **(D)** – Secção transversal do estilo da flor de pitangueira, um dia após polinização, mostrando tubos polínicos (seta) crescendo entre células (\blacktriangleright) do tecido transmissor; Barra = 25 μ m. **(E)** – Tubos polínicos no tecido transmissor, mostrando tampões de calosa (setas); Barra = 20 μ m. **(F)** – Parte superior do pistilo de flor coletada a campo, oriunda de polinização livre, apresentando grande quantidade de tubos polínicos germinados e percorrendo o tecido transmissor; Barra = 50 μ m. Figuras C, D, E e F: Corante Azul de anilina. Fotos: Rodrigo Cezar Franzon.

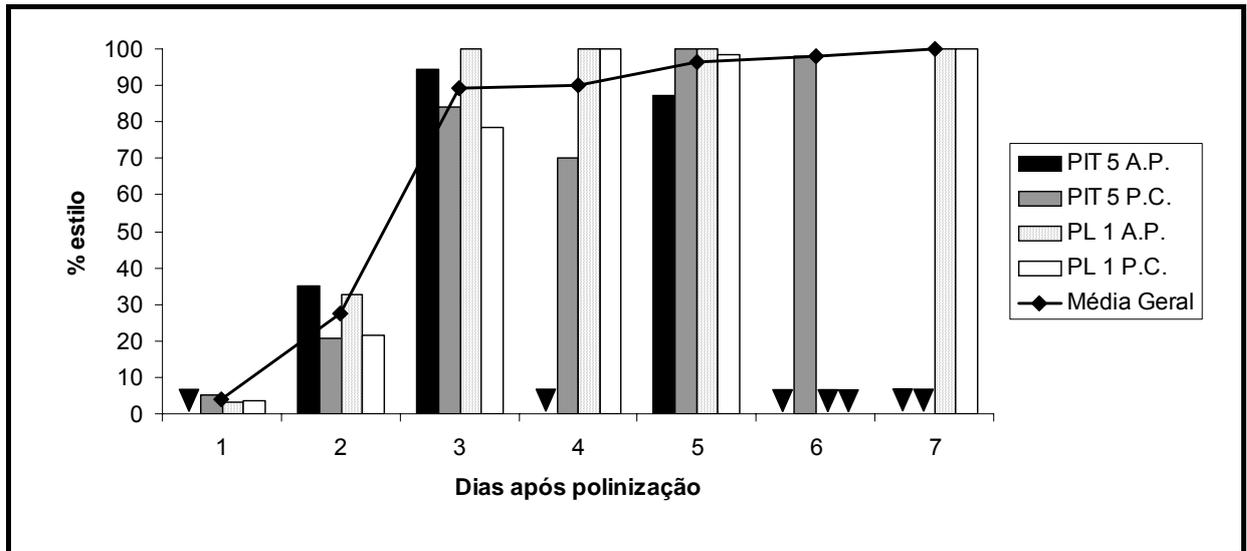


Figura 3 – Crescimento médio dos tubos polínicos no estilo de flores autopolinizadas e de polinização cruzada, em duas plantas de pitangueira (“Pit 5” e “PL 1”), em condições de laboratório, desde o primeiro dia após a polinização até sete dias depois. (▼ = não analisado). Legenda: A.P. = autopolinização; P.C. = polinização cruzada.

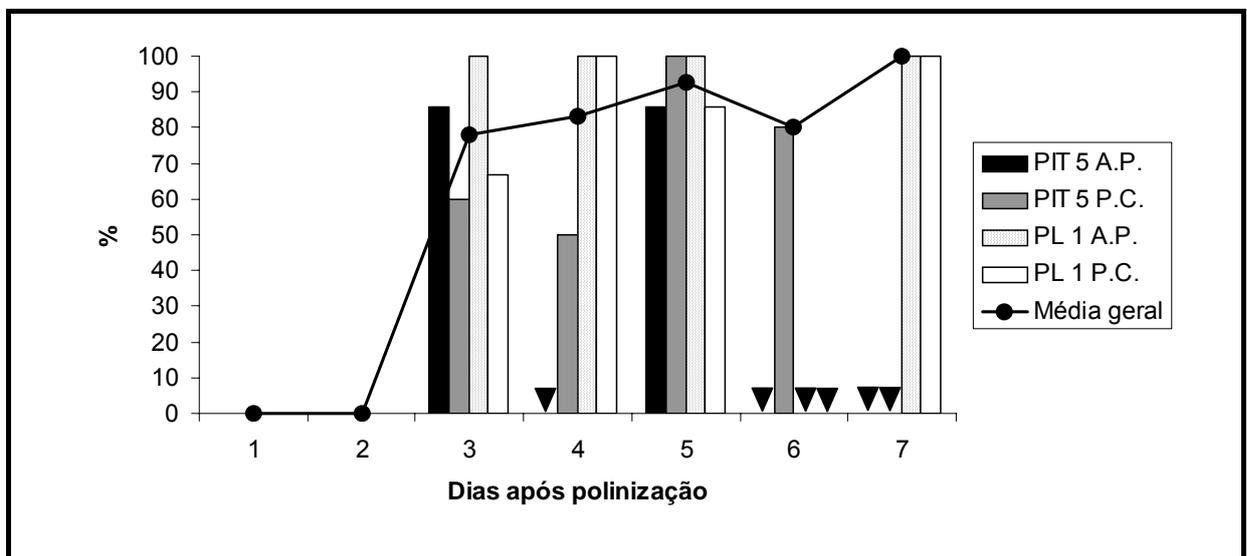


Figura 4 – Porcentagem de pistilos de flores de duas plantas de pitangueira (“Pit 5” e “PL 1”), com tubos polínicos na base do estilo, em condições de laboratório, desde o primeiro dia após a polinização até sete dias depois. (▼ = não analisado). Legenda: A.P. = autopolinização; P.C. = polinização cruzada.

Embora os tubos polínicos tenham alcançado a base do estilo já no terceiro dia, o número médio seguiu aumentando, na média geral, até o quinto dia (Figura 5). A partir deste dia, a tendência é que ocorra uma estabilização do número de tubos na base do estilo, pois os mesmos já atingiram o ovário a partir do terceiro dia e, degeneração do estilo foi observada a partir do quarto dia.

A partir da entrada no ovário o comportamento não segue o padrão de desenvolvimento observado em outras espécies. Tubos polínicos foram observados, no interior do ovário das flores, crescendo sem direção definida e, por vezes, enovelando-se próximo aos óvulos, quando o normal seria penetrar pela micrópila e fecundar o óvulo.

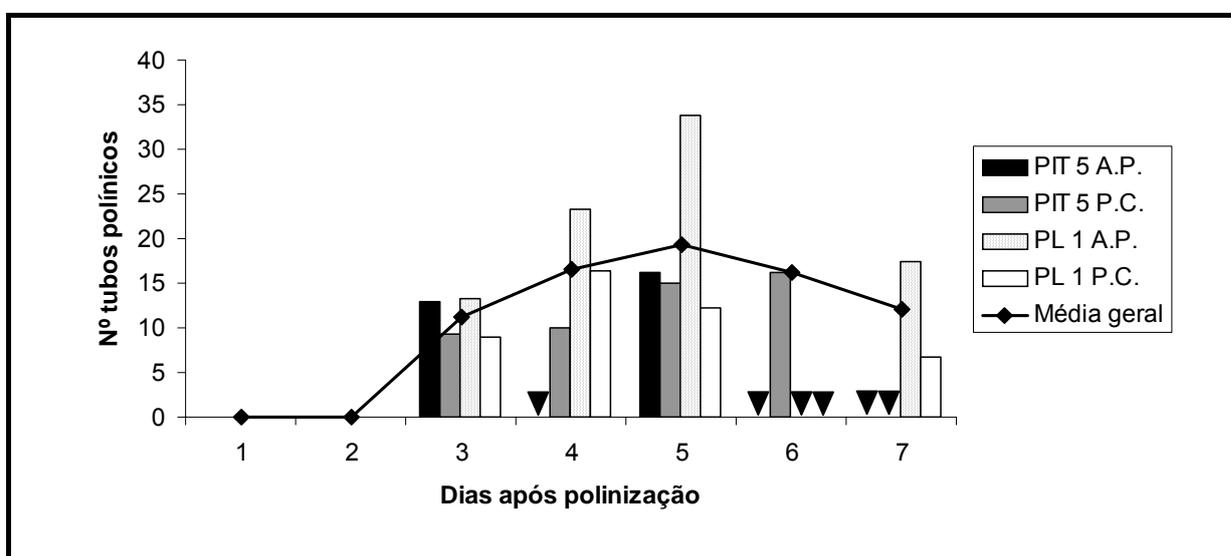


Figura 5 – Média do número de tubos polínicos que alcançaram a base do estilo, em flores de duas plantas de pitangueira (“Pit 5” e “PL 1”), em condições de laboratório, desde o primeiro dia após a polinização até sete dias depois. (▼ = não analisado). Legenda: A.P.= autopolinização; P.C. = polinização cruzada.

3.3.2 Estrutura geral do pistilo

Não foram observadas diferenças anatômicas entre os estigmas submetidos à autopolinização e polinização cruzada. Entretanto, diferenças são observadas entre pistilos polinizados e não polinizados, já no primeiro dia após a polinização. O estigma das flores de pitangueira é formado por papilas, que, na antese, produzem uma secreção estigmática para o exterior. Em flores virgens, estas papilas são compactadas e bem organizadas (Figura 6A), enquanto que em flores polinizadas

ocorre uma desorganização destas, bem como diminuição da secreção estigmática (Figura 6B), resultado do processo de germinação dos grãos de pólen e da passagem dos tubos polínicos.

A aplicação do corante PAS resultou em coloração vermelho/rosa, tanto no estigma, quanto na secreção estigmática (Figura 6C), e também no canal transmissor, indicando a presença de carboidratos insolúveis. Em flores polinizadas há uma tendência de diminuição na intensidade da coloração.

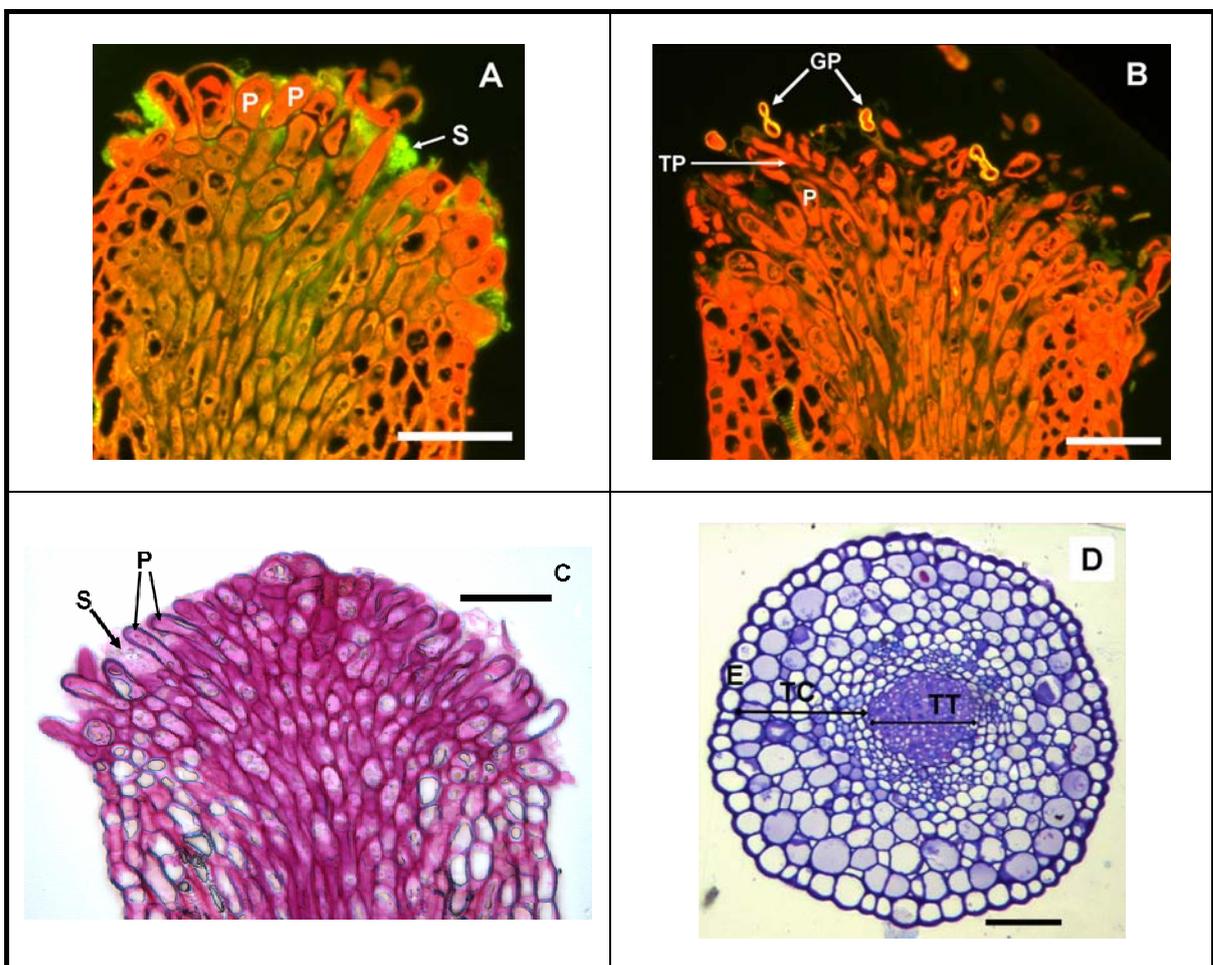


Figura 6 – Pistilo da flor de pitangueira: **A** – Estigma de flor virgem, um dia após antese. S: secreção, P: papilas. Corante: *Laranja de acridina*; Barra = 50µm. **B** – Estigma de flor com um dia após polinização (observam-se papilas desorganizadas e diminuição da secreção). GP: grão de pólen, TP: tubo polínico. Corante: *Laranja de acridina*. Barra = 50µm. **C** – Estigma de flor virgem, um dia após a antese. S: secreção, P: papilas. Corante: *PAS*. Barra = 50µm. **D** – Secção transversal do estilo da flor, ±2mm abaixo do estigma, um dia após polinização. E: epiderme, TC: tecido cortical, TT: tecido transmissor. Corante: *PAS+Azul de toluidina*. Barra = 50µm. Fotos: Rodrigo Cezar Franzon.

O estilo é compacto, e compreende a epiderme, um tecido cortical espesso, e o tecido transmissor (Figura 6D). A epiderme é formada por uma camada de células, as quais colorem intensamente com Auramina O (foto não apresentada), indicando a presença de cutina, tanto em pistilos polinizados como não polinizados. Imediatamente abaixo do estigma inicia-se o tecido transmissor, de forma cilíndrica, localizado no centro do estilo. O estilo aumenta de tamanho (diâmetro) em direção a base, mas o mesmo não acontece com o tecido transmissor, que parece sofrer um afunilamento. Este tecido está rodeado por feixes vasculares (Figura 7A). Existem espaços entre as células do tecido transmissor, os quais são ocupados por uma secreção, por onde se desenvolvem os tubos polínicos.

Em flores não polinizadas, ou com um dia após a polinização, as células ao redor do tecido transmissor do estilo apresentam grãos de amido (Figura 7B). Diferentemente, estes grãos de amido não são encontrados, ou são observados em pequenas quantidades, após a passagem dos tubos polínicos em pistilos com quatro dias após a polinização (foto não apresentada), independente da natureza do acasalamento (autopolinização ou polinização cruzada).

A presença de grãos de amido também é observada nas células da parede do ovário e da placenta (Figura 7C), o mesmo ocorrendo com as estruturas ovulares, principalmente em ovários de flores com até quatro dias após a antese. Observa-se uma zona de amido muito nítida ao redor da nucela em alguns óvulos (Figura 7D), enquanto que em outros óvulos isto não é observado com tanta nitidez. Aparentemente, esta quantidade de amido no ovário e nos óvulos diminui com o tempo após a polinização da flor, tanto em flores autopolinizadas quanto de polinização cruzada. Porém, estas observações não são conclusivas, e serão comprovadas com novos estudos, mais detalhados.

O ovário da flor de pitangueira apresenta dois lóculos, com muitos óvulos. Em contagens efetuadas, foram encontrados entre 50 e 88 óvulos em uma mesma flor, com uma média de 70 óvulos ($n = 9$).

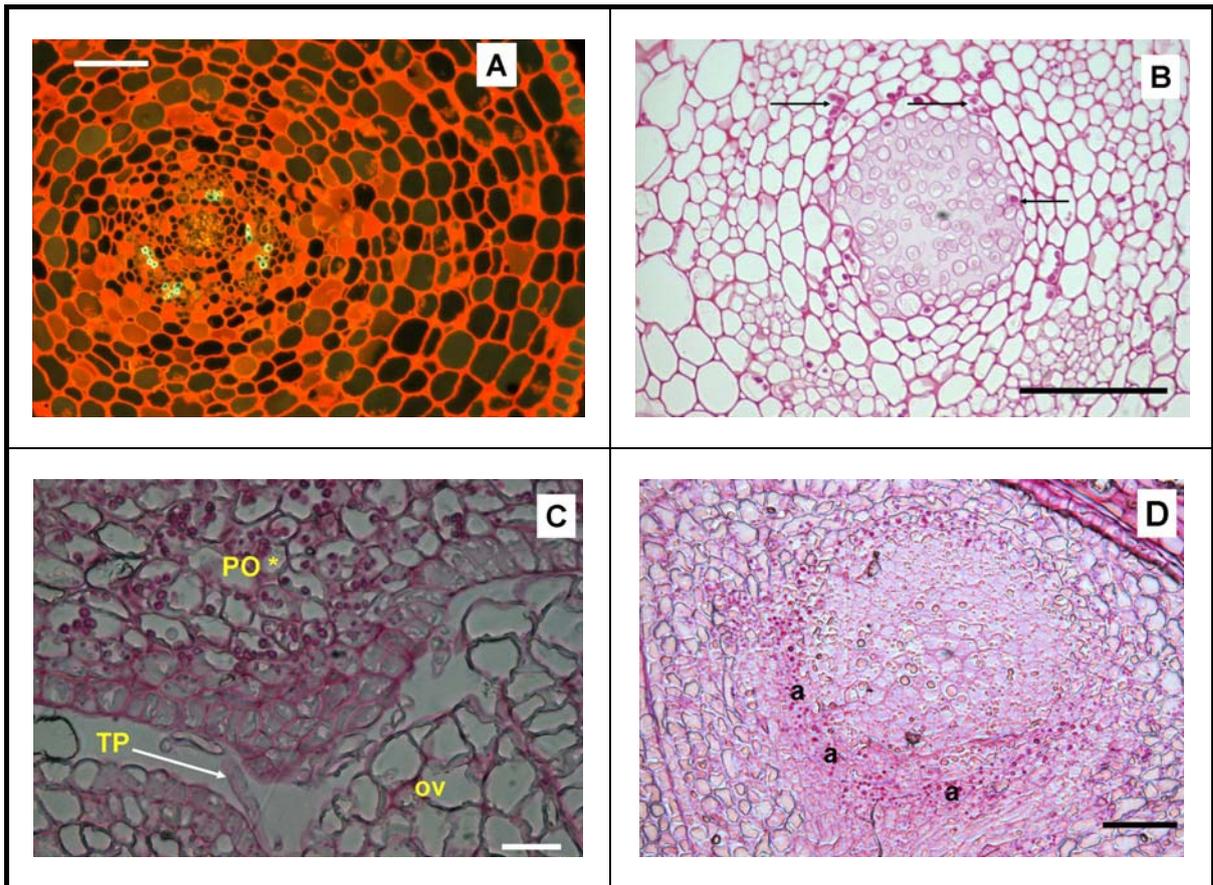


Figura 7 – Pistilo da flor de pitangueira: **A** – Secção transversal da base do estilo da flor, quatro dias após polinização. Corante: *Laranja de acridina*. Barra = 50 μ m. **B** – Secção transversal do estilo da flor, um dia após polinização, com grãos de amido (setas) ao redor do tecido cortical. Corante: *PAS*. Barra = 50 μ m. **C** – Detalhe da parede interior do ovário em pistilo com quatro dias após a polinização, mostrando concentração de grãos de amido (*) nas células. PO: parede do ovário. OV: óvulo. TP: tubo polínico. Corante: *PAS*. Barra = 20 μ m. **D** – Detalhe de um óvulo, mostrando uma zona de amido (a) ao redor da nucela. Corante: *PAS*. Barra = 50 μ m. Fotos: Rodrigo Cezar Franzon.

3.3.3 Frutificação efetiva

No geral, a média de frutificação efetiva foi maior em ramos de polinização livre (38,4%), seguido por aqueles ensacados com tela (13,6%) e ensacados com TNT (6,4%). Em todas as plantas observadas, as médias de frutificação efetiva foram maiores no tratamento de polinização livre (Tabela 10). Nas plantas 3, 5 e 7, estas médias não diferiram significativamente das médias de frutificação em ramos ensacados com tela. Não houve interação significativa entre os fatores analisados (planta x tratamento) (Apêndice D).

Tabela 10 – Frutificação efetiva média em sete plantas de pitangueira, submetidas a diferentes tratamentos de polinização (T1 – ramos ensacados com TNT; T2 – ensacados com tela anti-afídeo; T3 – polinização livre).

Trat.	Frutificação efetiva (%)							Média*
	Planta*							
	PL 1	PL 2	PL 3	PL 4	PL 5	PL 6	PL 7	
T1	17,0 b	6,6 b	4,1 b	7,6 b	3,3 b	0,4 b	5,8 b	6,4 c
T2	16,5 b	2,4 b	21,1 ab	8,8 b	6,2 ab	7,7 b	32,8 a	13,6 b
T3	54,4 a	27,4 a	44,4 a	33,9 a	22,9 a	36,1 a	49,5 a	38,4 a
Média*	29,3	12,1	23,2	16,8	10,8	14,7	29,4	
	A	C	ABC	ABC	C	BC	AB	
Média geral						19,5		
Coeficiente de variação (%)						36,87		

* Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

3.4 Discussão

3.4.1 Cinética dos tubos polínicos

Conforme observado, o crescimento dos tubos polínicos, até a chegada ao ovário, é relativamente rápido. A partir do terceiro dia após a polinização, tubos polínicos são observados no interior do ovário das flores e, a partir do quarto dia também foi possível observar tubos polínicos introduzindo-se através da micrópila. Em algumas espécies de Myrtaceae, o crescimento dos tubos polínicos é lento, tardando 15 dias para atingir a base do estilo, como ocorre em *Metrosideros excelsea* (SCHMIDT-ADAM; MURRAY, 2002).

Diferenças no que se refere ao tempo decorrido até a chegada dos tubos polínicos à base do estilo são observadas entre espécies do mesmo gênero. No gênero *Prunus*, os tubos polínicos tardam sete dias para chegar à base do estilo da flor de pessegueiro (*P. persica*) (HERRERO; ARBELOA, 1989), enquanto que em damasqueiro (*P. armeniaca*) demoram entre três e quatro dias (RODRIGO; HERRERO, 2000).

Em pitangueira não foram observadas diferenças no padrão de crescimento dos tubos polínicos entre os tratamentos autopolinização e polinização cruzada (Figura 3). Comparando estes percentuais, observa-se que em pistilos oriundos de autopolinização o crescimento foi ligeiramente superior, principalmente no segundo e terceiro dias. Entretanto, estas médias não diferem entre si pelo teste *t* de

comparação de médias (Apêndice E), não havendo, portanto, evidência de incompatibilidade ao longo do estilo.

3.4.2 Estrutura geral do pistilo e interação pólen-pistilo

O estigma de pitangueira apresenta papilas em sua superfície. Silva e Pinheiro (2007) também mencionam que o estigma de pitangueira é formado por papilas, e classificam-no como sendo do tipo seco. Estigmas do tipo seco também são citados em seis gêneros de Myrtaceae estudados na região central do Brasil, dentre eles *Eugenia* (PROENÇA; GIBSS, 1994). De acordo com Lughadha e Proença (1996), isto parece ser norma no grupo Myrtoideae, o qual inclui todos os gêneros de espécies de Myrtaceae que apresentam frutos carnosos.

Nos estigmas do tipo seco, eventos na pré-polinização incluem o desenvolvimento de uma secreção extracuticular, que serve para adesão do pólen compatível, sua hidratação e o rompimento da cutícula, facilitando a penetração dos tubos polínicos (HESLOP-HARRISON, 2000). A utilização de corantes como Laranja de acridina e PAS demonstra a presença de secreção na superfície estigmática em pitangueira, provavelmente a mesma descrita por este autor.

Entretanto, em algumas espécies de Myrtaceae o estigma é classificado como sendo do tipo úmido, como é o caso do camu-camu (*Myrciaria dubia*), espécie nativa do Brasil (MAUÉS; COUTURIER, 2002). Estigma do tipo úmido também é encontrado em *Melaleuca* e *Callistemon*, e muitas espécies de *Eucalyptus* (HESLOP-HARRISON; SHIVANNA, 1977; SEDGLEY; SMITH, 1989).

Went e Willemse (1984) destacam que a principal função da secreção estigmática é servir como meio para aderência e hidratação do pólen. Porém, ela pode auxiliar na germinação dos grãos de pólen e crescimento inicial dos tubos polínicos (HESLOP-HARRISON; SHIVANNA, 1977; CLIFFORD; SEDGLEY, 1993), embora em algumas espécies este crescimento, até a chegada ao tecido transmissor, seja autótrofo (HERRERO; DICKINSON, 1980). A diferença na intensidade da coloração por PAS entre estigmas virgens e polinizados, em pitangueira, sugere que a secreção está sendo consumida na germinação e no crescimento inicial dos tubos polínicos.

Segundo Herrero e Dickinson (1979), o crescimento do tubo polínico, a partir da chegada ao tecido transmissor é heterótrofo, dependente das reservas estilares

e, em algumas espécies, o desaparecimento do amido nesta região é uma resposta à polinização. No estilo das flores de pitangueira, os grãos de amido presentes nas células adjacentes ao tecido transmissor desaparecem após a passagem dos tubos polínicos, ocorrendo um aumento de secreção no interior deste tecido. Esta secreção tem um papel nutricional e também é responsável por guiar a passagem dos mesmos durante o seu trajeto até o ovário (HESLOP-HARISON, 2000; RODRIGO; HERRERO, 2000). A presença de amido como reserva nutricional no estilo é descrito para várias espécies (RODRIGO et al., 1997). De acordo com estes mesmos autores, a reação positiva com PAS indica não somente a presença de amido, mas também de outros carboidratos insolúveis.

Em *Petunia*, a redução de amido é relacionada com autocompatibilidade (HERRERO; DICKINSON, 1979), ocorrendo uma pronunciada redução na concentração de amido no estilo após a passagem de tubos polínicos compatíveis, o que não ocorre quando existe incompatibilidade. Em *Metrosideros excelsea* (Myrtaceae), auto-incompatibilidade ocorre no ovário, e tanto em pistilos autopolinizados ou de polinização cruzada ocorre diminuição do amido presente no estilo (SCHMIDT-ADAM; MURRAY, 2002), sugerindo, portanto, que a mobilização deste amido é uma resposta ao crescimento do tubo polínico, independente da natureza do acasalamento.

Em pitangueira, ocorre uma situação semelhante, ou seja, diminuição do amido do estilo com a passagem dos tubos polínicos, independente da natureza do pólen (autopolinização ou polinização cruzada), indicando que isto é uma resposta à polinização.

Uma diminuição do amido presente em células da parede do ovário e da placenta, após a passagem dos tubos polínicos, também foi observada. Tudo indica que este amido está sendo degradado em açúcares solúveis e utilizado no desenvolvimento destes tubos. Secreção sobre a superfície da placenta é descrita em diversas espécies, em diferentes classes botânicas (SAGE et al., 1994 *apud* HERRERO, 2003) e, conforme já discutido, esta secreção seria a responsável por nutrir os tubos polínicos durante o seu desenvolvimento no ovário, bem como guiá-los em direção aos óvulos.

A mesma observação é válida para o amido presente na nucela, que estaria sendo degradado em açúcares solúveis e utilizado durante o desenvolvimento do saco embrionário. As reservas de amido presente nos óvulos têm papel importante

na nutrição do saco embrionário, como no caso do pessegueiro (ARBELOA; HERRERO, 1991), onde a quantidade destas reservas diminui depois que ocorre a fecundação. Em damasco (RODRIGO; HERRERO, 1998), outra espécie de *Prunus*, ocorre fato semelhante, onde o desenvolvimento do óvulo após a antese é dependente das reservas de amido nele presentes. No caso da pitangueira, ainda é difícil fazer esta relação, pois a presença de um grande número de óvulos dificultou a observação.

Entretanto, o que chama a atenção é o comportamento dos tubos polínicos no ovário das flores. Embora o crescimento no estigma e no estilo seja o normalmente observado em outras espécies, sendo guiados pelas secreções pistilares, bem como são observadas uma grande quantidade de tubos crescendo na base do estilo, no ovário este padrão não fica claro, com um crescimento sem direção definida e muitas vezes enovelando-se próximo aos óvulos. Fato semelhante foi relatado em estudos anteriores (FRANZON, 2004), e também em araçazeiro (*P. cattleyanum*) (RASEIRA; RASEIRA, 1996). Neste último, os autores sugerem que poderia ser um mecanismo de incompatibilidade. Entretanto, não estão elucidados os fatores que implicam neste padrão de crescimento.

Outro aspecto interessante é a relação número de sementes/óvulo. Em outras espécies fruteiras, como no pessegueiro (*P. persica*), na amendoeira (*P. dulcis*) e no damasqueiro (*P. armeniaca*), existem dois óvulos, sendo que um se desenvolve e forma semente enquanto que outro degenera. Existem ainda aquelas espécies que apresentam um grande número de óvulos, mas também formam um grande número de sementes, como o kiwi (*Actinidia deliciosa*) (HOWPAGE et al., 1998) e o araçazeiro (RASEIRA; RASEIRA, 1996), dentre outras. Porém, um número elevado de óvulos com a formação de apenas uma ou duas sementes, como na pitangueira e outras espécies de *Eugenia*, é raro, embora existam espécies com ovários multiovulados, nos quais ocorre a degeneração de óvulos até que reste somente um que continue seu desenvolvimento (CHARLESWORTH, 1989). No entanto, há um desconhecimento das causas que provocam esta degeneração (RODRIGO; HERRERO, 2000).

Esta degeneração pode ser devida a fatores extrínsecos ou intrínsecos aos óvulos. Uma revisão detalhada sobre estes fatores é apresentada por Rodrigo e Herrero (1998; 2000). Dentre os fatores extrínsecos, pode estar envolvida uma polinização inadequada (BURD, 1994), ou a falta de reservas para que mais óvulos

possam se desenvolver em uma mesma flor (MARSHALL; ELLSTRAND, 1988), uma vez que uma baixa razão semente/óvulo pode ser resultado de competição seletiva, entre os embriões em desenvolvimento, por recursos maternos (ARATHI et al., 1996). Em relação à polinização, isto não parece ser problema para a pitangueira, nas condições do presente trabalho. A espécie produz pólen em grande quantidade (SILVA; PINHEIRO, 2007), e o pólen é viável, com razoável percentagem de germinação *in vitro* (FRANZON et al., 2007). Como estes testes normalmente subestimam a viabilidade, é provável que a germinação *in vivo* seja maior do que aquela observada *in vitro*. Em relação ao estigma, o mesmo está receptivo durante o processo de abertura floral, e a deiscência das anteras normalmente ocorre pouco tempo após, expondo totalmente os grãos de pólen, não havendo qualquer restrição a sua coleta por agentes polinizadores (SILVA; PINHEIRO, 2007). As flores são atrativas para insetos e durante a floração são observados agentes polinizadores, normalmente abelhas melíferas, visitando-as. Silva e Pinheiro (2007) destacam que as flores de pitangueira são denominadas de “flores-pólen”, pelo fato do pólen ser o único recurso floral oferecido aos polinizadores. Ainda, o pólen, tanto de autopolinização quanto de polinização cruzada, germina e se desenvolve normalmente no pistilo das flores, sendo que o desenvolvimento até alcançar o ovário é rápido, pois a partir do terceiro dia já são observados tubos polínicos na base do estilo.

Em relação às reservas, nada pode-se afirmar para pitangueira, pois estas não foram quantificadas. Porém, sabe-se que em algumas espécies do gênero *Prunus* estas reservas (amido) estão relacionadas com o desenvolvimento e a degeneração de óvulos (PIMIENTA; POLITO, 1982; ARBELOA; HERRERO, 1985; RODRIGO; HERRERO, 1998).

Além dos fatores extrínsecos, existem também muitos fatores intrínsecos que provocam a degeneração de óvulos (HERRERO, 1992), a qual pode ocorrer antes ou depois da fecundação (DAHL; FREDRIKSON, 1996). Dentre os processos pré-zigóticos que podem afetar o desenvolvimento dos óvulos, são citadas a deficiência para atrair os tubos polínicos (HERRERO, 1992), ou ainda a malformação dos óvulos (PALSER et al., 1990). Por outro lado, os primeiros óvulos fecundados podem inibir a entrada de tubos polínicos em outros óvulos (RAJU et al., 1996), ou impedir o desenvolvimento de seus megagametófitos (SEDGLEY, 1981), fazendo com que não ocorra a fecundação (RODRIGO; HERRERO, 2000).

Depois da fecundação, o número de óvulos pode ser regulado pelo aborto de embriões (RODRIGO; HERRERO, 2000), e, embora se desconheça o funcionamento deste processo, são apontadas como possíveis causas o momento em que ocorre a fecundação (MOGENSEN, 1975), a posição do óvulo dentro do ovário (WIENS et al., 1987), abortos seletivos, que variam de acordo com o genótipo (CASPER; WIENS, 1981) e a produção de inibidores de crescimento de embriões por parte dos embriões dominantes (GANESHIAH; SHAANKER, 1988).

Um trabalho mais detalhado sobre o desenvolvimento dos óvulos em pitangueira foi realizado por Silva (2006), no sudeste brasileiro. O autor classifica o óvulo de *E. uniflora* como hemicampilótrofo, unitegmo, crassinucelado, com obturador tegumentar, e observou que, a partir do terceiro dia após a polinização, ocorrem dois tipos de desenvolvimento seminal em diferentes óvulos. Em certas sementes o desenvolvimento é convencional, com a presença de um embrião globular, endosperma nuclear volumoso e nucela com células vacuoladas e citoplasma denso no quarto dia pós-polinização. No outro tipo de desenvolvimento, foram encontradas estruturas volumosas de contornos circulares, pluricelulares, com protoderme e circundadas pelo endosperma, em sementes de sete dias pós-polinização. Estas estruturas foram interpretadas como embriões adventícios de origem nucelar, sendo que o desenvolvimento destes embriões é muito veloz e dependente da fecundação, o que sugere a ocorrência de competição por recursos maternos entre embriões zigóticos e adventícios. No entanto, o autor afirma que, embora esta hipótese possa explicar a baixa relação semente/óvulo em pitangueira, ela necessita ser confirmada.

Uma das hipóteses formulada em trabalhos anteriores (FRANZON, 2004) como responsável para uma baixa relação semente/óvulo em pitangueira é o diferente estágio de desenvolvimento dos óvulos. Uma vez fecundados aqueles maduros, eles seriam um dreno maior para os nutrientes, causando o depauperamento dos que estavam imaturos. Entretanto, isto também não está claro, e futuros trabalhos elucidarão esta incógnita.

3.4.3 Frutificação efetiva

A frutificação obtida à campo mostra claramente a necessidade de agente polinizador em pitangueira. Em média, a frutificação em ramos de polinização livre

(38,4%) foi seis vezes maior do que em ramos ensacados com TNT (6,4%), e quase três vezes maior do que em ramos ensacados com tela anti-afídeo (13,6%). Da mesma forma, a frutificação obtida em ramos ensacados com tela foi duas vezes maior do que aquela de ramos ensacados com TNT, indicando uma possível atuação do vento como agente polinizador.

Estes resultados contrastam com aqueles obtidos por Silva (2006), que não observou diferenças significativas entre a percentagem de frutificação decorrente de autopolinização passiva e do tratamento controle. Entretanto, quando as flores foram polinizadas manualmente, os resultados foram muito superiores, seja em flores autopolinizadas ou em flores de polinização cruzada.

As grandes diferenças observadas na frutificação a campo estão de acordo com os dados obtidos em laboratório, onde pistilos que não foram polinizados não apresentaram grãos de pólen no estigma ou tubos polínicos crescendo no estilo, sugerindo que a ocorrência de frutificação por autopolinização passiva seja baixa. Resultados similares foram obtidos em trabalhos anteriores (FRANZON, 2004), cujas flores foram coletadas em estádio de balão e levadas para laboratório, e a percentagem média de pistilos com pólen no estigma foi relativamente baixa, entre 13,5% e 17,1%. Já, em pistilos coletados no pomar, oriundos de polinização livre, entre 45,5% e 76,9% destes estavam polinizados. Esta diferença significativa foi atribuída à atuação de agentes polinizadores, principalmente abelhas. Entretanto, pelos resultados do presente trabalho, poderia ser qualquer outro agente polinizador, inclusive o vento, ou mesmo ocorrer polinização por gravidade, ou seja, pólen de flores superiores caírem e polinizarem as inferiores.

Diferentemente do discutido no parágrafo anterior, Silva e Pinheiro (2007) relatam que estigmas de flores ensacadas, com o objetivo de excluir agentes polinizadores, mostraram uma quantidade significativa de grãos de pólen sobre o estigma, podendo assim promover a autopolinização automática. Porém, estes autores não mencionam qual a percentagem de pistilos apresentavam-se nesta condição.

A pitangueira é caracterizada pela floração em massa, com uma grande produção de flores em curto espaço de tempo (SILVA; PINHEIRO, 2007), assim como ocorre em outras espécies de Myrtaceae (BEARDSELL et al., 1993; LUGHADHA; PROENÇA, 1996). Este padrão de floração é classificado como do tipo *big-bang* (floração em massa) (LUGHADHA; PROENÇA, 1996) e é uma estratégia

para atrair polinizadores (O'BRIEN; CALDER, 1993). Em espécies autocompatíveis que necessitam a ação de polinizadores para uma maior taxa frutificação, a floração em massa pode ser uma estratégia para promover a autofertilização (BEARDSELL et al., 1993), pois além de atrair polinizadores, faz com que os mesmos permaneçam mais tempo forrageando na mesma planta.

Os resultados obtidos até o momento evidenciam que *E. uniflora* é autocompatível. Silva (2006) classifica a espécie como parcialmente autocompatível, com índice de autocompatibilidade igual a 0,62, sendo consideradas autocompatíveis espécies com índice acima de 0,75 (LLOYD; SCHOEN, 1992). Assim, a produção de frutos pode ocorrer por geitonogamia, que é aquela em que ocorre polinização com a transferência de pólen entre flores da mesma planta, embora a produção de frutos por autopolinização passiva possa ocorrer (SILVA; 2006). Mahoro (2003) destaca que geitonogamia pode ser um fator limitante em espécies com autocompatibilidade incompleta e, de acordo com Sedgley e Smith (1989), mesmo em espécies autocompatíveis é possível que exista competição entre pólen da própria flor e aquele oriundo de flores diferentes, podendo ocorrer maior sucesso na frutificação quando ocorre polinização cruzada.

3.5 Conclusões

- A pitangueira é autocompatível, mas necessita de insetos polinizadores para uma melhor frutificação.
- O desenvolvimento dos tubos polínicos, até a chegada ao ovário, é normal e contínuo, alcançando a base do estilo a partir do terceiro dia.
- O amido presente no pistilo é metabolizado e utilizado durante o desenvolvimento dos tubos polínicos.

4 CAPÍTULO III – Marcadores AFLP no estudo da variabilidade genética de populações de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

4.1 Introdução

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) apresenta quatro diferentes centros de diversidade no Brasil: Nordeste-Caatinga, Sul-Sudeste, Brasil Central-Cerrado, e Mata Atlântica (DONADIO et al., 2002). Esta espécie faz parte do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de fruteiras nativas da Região Sul do Brasil, mantido na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS. Além da manutenção e preservação do germoplasma *ex situ*, são realizados trabalhos de caracterização das espécies. Também vem sendo realizado um trabalho de seleção dos melhores genótipos, principalmente quanto à caracteres dos frutos.

Paralelamente, vem sendo conduzidos estudos para entender o modo de polinização e reprodução desta espécie, com o objetivo de saber se ocorre autopolinização, ou se a maioria dos descendentes de uma planta mãe são oriundos de polinização cruzada. Informações desta natureza são importantes para o manejo, principalmente quando se pensa na introdução de uma espécie em cultivos comerciais, bem como para trabalhos de melhoramento genético e em trabalhos de preservação. Uma alternativa para avaliar a variabilidade em populações seria a caracterização morfológica, fenológica e agrônômica dos indivíduos. Entretanto, a caracterização de genótipos, bem como o estudo da variabilidade com base nestes caracteres, apresenta uma série de limitações. Dentre estas limitações, podem ser citadas: a demora na avaliação; não pode ser realizada em qualquer período do ano;

em plantas frutíferas muitas avaliações somente são possíveis de serem realizadas quando estas entram em produção, requerendo, assim, um custo elevado e tempo prolongado para análise; acessar pequena porção do genoma da planta; os marcadores morfológicos existem em número limitado, além de ser dependente e influenciada pelo ambiente (DETTORI; PALOMBI, 2000; SALLA et al., 2002; BIANCHI et al., 2003; YAMAGISHI et al., 2005).

Outro inconveniente é que essas avaliações são feitas de forma subjetiva, e o resultado pode variar de acordo com a percepção dos responsáveis pela avaliação. Ainda, conforme já mencionado, podem sofrer interferências ambientais, que influenciam na expressão do genótipo, principalmente quando se trata de estudos envolvendo cultivares ou genótipos com características muito similares (GREGOR et al., 1994; BELLINI et al., 1998; CASSAS et al., 1999).

Como alternativa a estes inconvenientes, surgiram novas metodologias para a caracterização genética de plantas. Dentre estes métodos, aqueles que revelam polimorfismo de seqüências de DNA, conhecidos como marcadores moleculares, têm sido de grande importância para acessar a variabilidade genética dentro do “*pool*” gênico de espécies cultivadas, bem como na análise da diversidade e caracterização de germoplasma (SALLA et al., 2002; FERREIRA et al., 2007).

De acordo com Vieira (2002), marcador genético é uma caractere que é capaz de detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos, e podem ser divididos em dois grupos: 1) aqueles que indicam produtos gênicos e, 2) aqueles que são seqüências de DNA. No primeiro grupo se enquadram os marcadores morfológicos e as isoenzimas (MARKERT; MOLLER, 1959). Já, no segundo grupo estão: os AFLPs – Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (VOS et al., 1995); os RFLPs – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA cortados (BOTSTEIN et al., 1980), os RAPDs – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990), e os SSRs – microssatélites (LITT; LUTY, 1989).

Os marcadores de DNA apresentam vantagens e superam muitos dos limites dos marcadores morfológicos e bioquímicos, uma vez que detectam variação em nível de DNA, além de poderem ser obtidos em grande número e não sofrerem influência de fatores ambientais e estágio de desenvolvimento da planta (BORÉM, 1998; UPADHYAY et al., 2004). Estes marcadores têm sido usados em diferentes espécies fruteiras e outras espécies perenes para identificação varietal, avaliar

similaridade e relação genética entre genótipos, monitorar variabilidade genética, construir mapas genéticos e encontrar marcadores para características de interesse agrônômico, bem como para realizar seleção assistida por marcadores ou para introgressão de genes (WILLIAMS et al., 1990; MEHLENBACHER, 1995; PIGATO; LOPES, 2001; SALLA et al., 2002; UPADHYAY et al., 2004).

Por se tratar de uma espécie perene, o estudo da variabilidade genética em pitangueira, por meio de características fenotípicas, demanda longo período de tempo, principalmente para que as plantas entrem em produção. De acordo com Viana et al. (2003), o uso de marcadores moleculares na avaliação da variabilidade genética é altamente viável, pois permite caracterizar indivíduos de qualquer espécie de maneira precoce e em menor espaço de tempo.

Diversas técnicas de marcadores moleculares, como AFLP, RAPD e SSRs, baseadas na reação de polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction), têm sido extensivamente utilizadas para análises de variabilidade e diversidade dentro e entre diferentes espécies (CARDOSO et al., 2000; DRUMMOND et al., 2000; MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004; JACQUEMYN et al., 2007), bem como para caracterizar e descrever germoplasma, em diferentes regiões do mundo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CERVERA et al., 1998; BREYNE et al., 1999). Também são utilizados para traçar estratégias de conservação de espécies ameaçadas de extinção (DRUMMOND et al., 2000; AGROMONTI et al., 2007) e, muitas vezes, são aplicados em conjunto com marcadores morfológicos (CASTRO et al., 2003).

A técnica de AFLP (VOS et al., 1995) é baseada na detecção de polimorfismo no comprimento de fragmentos, e combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição, com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Desta forma, permite uma alta cobertura do genoma e não exige que se tenha um conhecimento prévio do genoma analisado, podendo ser utilizada para DNAs de qualquer origem e complexidade.

A análise através do uso de AFLP (VOS et al., 1995) é realizada em quatro etapas: 1) o DNA do indivíduo é clivado por enzimas de restrição (uma de corte raro e uma de corte freqüente); 2) adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos de DNA gerados pela clivagem; 3) uma parte dos fragmentos gerados é amplificado seletivamente via PCR, utilizando iniciadores especificamente

construídos para reconhecer seqüências nos adaptadores; 4) a sub-população de fragmentos amplificados é separada, por eletroforese, em gel de alta resolução.

Como principais vantagens desta técnica, pode-se destacar: o índice “multiplex”, ou seja, o número de marcadores simultaneamente analisados em um único gel; é uma técnica altamente reproduzível; e o grande poder de detecção de variabilidade genética, pois gera um grande número de marcadores polimórficos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; BREYNE et al., 1999). Isto faz com que a técnica seja bastante útil em análises de paternidade, na determinação de fluxo gênico, na identificação de variedades, em estudos de diversidade genética e, principalmente, no mapeamento genético (VIEIRA, 2002). A principal desvantagem é que os marcadores AFLP são marcadores dominantes. Mesmo assim, a técnica é muito útil, pois o número de marcadores analisados simultaneamente em um único gel pode ser muito alto.

De acordo com Margis et al. (2002), análises AFLP têm sido usadas para descrever a estrutura da população e polimorfismo genético de diversas espécies vegetais, incluindo soja, cevada, milho e arroz. Em fruteiras, tem sido utilizada em análises com pessegueiro (ARADHYA et al., 2004), várias espécies de *Citrus* (BRETÓ et al., 2001), em videira (CERVERA et al., 1998) e com ameixeira japonesa (VIEIRA et al., 2005), dentre outros.

Porém, poucos registros são encontrados na literatura em relação ao uso de marcadores moleculares em espécies nativas do Sul do Brasil. Schuch et al. (2002) utilizaram marcadores RAPD para avaliação da variabilidade genética desta espécie em banco de germoplasma. Erig et al. (2003) utilizaram marcadores RAPD para avaliar a variabilidade genética em araçazeiro (*Psidium cattleianum*). Dettori e Palombi (2000) utilizaram marcadores RAPD para elaborar “fingerprinting” em acessos de *Acca sellowiana* e para avaliar a variabilidade disponível em plantas domesticadas, anteriormente introduzidas de diversos países, existentes no banco de germoplasma da espécie mantida no Istituto Sperimentale per la Frutticoltura em Roma, na Itália. A técnica AFLP foi utilizada anteriormente em pitangueira (*E. uniflora*), com sucesso, para analisar o nível de variabilidade genética entre populações no Rio de Janeiro (MARGIS et al., 2002). Da mesma forma, Salgueiro et al. (2004), com o objetivo de estabelecer associação entre os diferentes fatores que influenciam a distribuição da variabilidade genética entre populações desta espécie,

distribuídas ao longo do litoral brasileiro, utilizaram esta mesma técnica, associada com SSRs e RFLP.

No presente trabalho foram utilizados marcadores AFLP para a avaliação de populações de plantas de pitangueira oriundas de autopolinização e de polinização livre, com o objetivo de verificar a variabilidade existente entre populações, visando fornecer mais informações que ajudem no entendimento do modo de reprodução desta espécie.

4.2 Material e Métodos

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS.

4.2.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado foi oriundo de duas seleções de pitangueira (“Pit 15” e “Pit 52”) do Banco Ativo de Germoplasma de fruteiras nativas do Sul do Brasil da Embrapa Clima Temperado. De cada seleção foram obtidas duas populações F1, entre fevereiro e março de 2006, por meio de autopolinização e de polinização livre, totalizando quatro populações. Para obtenção da população de autopolinização, foram ensacados ramos com botões florais próximo ao estágio de balão e, no dia da antese, as flores foram polinizadas manualmente com pólen da própria flor, para garantir a ocorrência da polinização. Quando maduros, os frutos foram colhidos e as sementes colocadas para germinar em bandejas de isopor, contendo como substrato uma mistura de terra local e areia, na proporção 3:1. Em setembro de 2006, as mudas foram repicadas para sacos plásticos, contendo o mesmo substrato, e permaneceram em casa de vegetação para desenvolvimento. Para a população de polinização livre, frutos foram colhidos ao acaso, na mesma época de colheita dos frutos de autopolinização, e colocados para germinar nas mesmas condições descritas acima.

Para identificação, as plantas estão divididas em dois grupos. Um grupo formado pela seleção “Pit 52” e suas progênies, doravante denominada Gp52a, quando oriunda de autopolinização e, Gp52L, quando derivada de polinização livre,

e outro grupo formado pela seleção “Pit 15” e suas progênes, doravante denominado Gp15a, quando oriunda de autopolinização e, Gp15L, quando derivada de polinização livre.

4.2.2 Extração do DNA

Em 2007, foi realizada a extração do DNA. Utilizou-se entre 0,15g e 0,20g de tecido vegetal, coletado de folhas jovens completamente expandidas, porém não muito lignificadas, de 20 indivíduos de cada uma das quatro populações, e das duas plantas mãe, totalizando 82 indivíduos. Para extração de DNA das plantas mãe, folhas jovens foram coletadas a campo.

O DNA utilizado nas análises de AFLP foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Para ressuspender o DNA foi utilizado 30 μ L de tampão TE (Tris-EDTA), pH 8,0, ao qual foi adicionado 1 μ L de RNase (10 μ g.mL⁻¹). A quantificação foi realizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, e revelado sob luz ultravioleta. A concentração de DNA, em ng. μ L⁻¹, foi realizada com base na comparação visual da intensidade das bandas com o padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III. As amostras de DNA foram diluídas para uma concentração final de 10ng. μ L⁻¹, em H₂O MilliQ[®] autoclavada.

4.2.3 Análises AFLP

4.2.3.1 Digestão do DNA

Inicialmente foram testadas duas concentrações de DNA (50ng ou 100ng) na reação de digestão, com seis amostras escolhidas ao acaso. Na seqüência dos trabalhos, optou-se por utilizar 100ng de DNA na reação de digestão.

Os reagentes utilizados em cada reação de digestão foram: 2 μ L de enzimas *Eco*RI/*Mse*I (1,25U. μ L⁻¹); 5 μ L Tampão 5x [Tris-HCl (pH 7.5) 10mM, Acetato Mg 10mM, Acetato K 50mM], ambos fornecidos pela Invitrogen. Utilizou-se 10 μ L de DNA (10ng. μ L⁻¹), e 8 μ L de H₂O MilliQ[®], suficiente para completar o volume final de reação (25 μ L). A reação foi incubada por três horas a 37°C, seguido por um período de 15 minutos a 70°C.

4.2.3.2 Ligação dos adaptadores

Os fragmentos resultantes da digestão foram ligados aos adaptadores específicos para os locais de restrição *EcoRI* e *MseI*. Nesta etapa, utilizou-se 10 μ L do DNA digerido, sendo adicionado 9,6 μ L de solução de ligação de adaptadores, do Kit *AFLP[®] Analysis System I* (Invitrogen), e 0,4 μ L da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). O material foi incubado por duas horas a 20°C.

4.2.3.3 Reação de pré-amplificação

Inicialmente, foram testadas duas diluições do produto da reação de ligação dos adaptadores, 1:5 e 1:10, em H₂O MilliQ[®] autoclavada, com as mesmas seis amostras escolhidas ao acaso na etapa de digestão do DNA. Por apresentar melhores resultados, na seqüência dos trabalhos utilizou-se a diluição 1:10.

As reações de pré-amplificação foram desenvolvidas em um volume final de 10 μ L, sendo composta por 1 μ L da solução resultante da ligação dos adaptadores diluída 1:10, 1 μ L do 10X PCR Buffer [Tris-HCl pH 8,4 (20mM), KCl (50mM)]; 0,5 μ L de MgCl₂ (50mM), ambos da Invitrogen; 0,8 μ L de dNTP mix (2,5mM de cada); 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5U. μ L⁻¹); 0,3 μ L do primer *EcoRI*+1 (50ng. μ L⁻¹); e 0,3 μ L do primer *MseI*+1 (50ng. μ L⁻¹), completando o volume com 5,9 μ L de H₂O MilliQ[®].

O programa de PCR utilizado seguiu o protocolo sugerido por Vos et al. (1995), num total de 20 ciclos, sendo cada ciclo composto por 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 56°C, e 60 segundos a 72°C. O produto da reação de pré-amplificação foi diluído, em H₂O MilliQ[®] autoclavada, na proporção 1:10, para então ser submetido à amplificação seletiva.

4.2.3.4 Amplificação final seletiva

Cada reação na amplificação seletiva foi realizada em um volume final de 10 μ L, contendo: 2,5 μ L da solução de DNA pré-amplificado diluída 1:10; 1 μ L de solução PCR buffer 10X [Tris-HCl pH 8,4 (20mM), KCl (50mM)]; 0,4 μ L de MgCl₂ (50mM); 8 μ L de dNTP mix (2,5mM); 0,3 μ L BSA (10mg. μ L⁻¹); 0,2 μ L de Taq DNA polymerase (5U. μ L⁻¹); 1,7 μ L de H₂O MilliQ[®] autoclavada; 2,0 μ L do primer *EcoRI*+3 (50ng. μ L⁻¹) e 0,3 μ L do primer *MseI*+3 (50ng. μ L⁻¹). O programa de PCR utilizado

segiu o protocolo proposto por Vos et al. (1995) (Tabela 11), e foram utilizadas três combinações de primers:

(P1) *EcoRI* +ACA – *MseI* +CTT;

(P2) *EcoRI* +AGC – *MseI* +CTT;

(P3) *EcoRI* +AAC – *MseI* +CAG.

Tabela 11 – Programa de PCR utilizado para Amplificação seletiva.

Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1-13	94°C por 10 segundos	65°C, 30 segundos (reduzindo 0,7°C em cada ciclo)	72°C, 1 min
14-36	94°C por 10 segundos	56°C, 30 segundos	72°C, 1 min

Todas as etapas das reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ao produto da reação de amplificação final (10µL) foram adicionados 4µL da solução tampão de carregamento (formamida deionizada 99%, EDTA 10mM, 0,025% de xileno-ciano e 0,025% de azul de bromofenol) e procedida a desnaturação das amostras a 94°C por 5min. Foram aplicados 6,0µL desta solução em gel de seqüenciamento (poliacrilamida 6% p/v, uréia 7M).

4.2.3.5 Eletroforese

Os fragmentos amplificados foram separados eletroforéticamente em gel desnaturante de poliacrilamida (6%), em uma corrida a 60-70W durante 2h50min. Estes fragmentos foram visualizados utilizando o protocolo de coloração com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001). O tamanho dos alelos foi estimado em comparação visual com o marcador de peso molecular de DNA de 25pb (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA).

4.2.3.6 Avaliação e análise estatística

Inicialmente, 20 indivíduos de cada população, mais a planta mãe, foram utilizados neste estudo. Entretanto, dois indivíduos de cada uma das populações

falharam nas reações com todos os pares de *primers* utilizados. Assim, foram utilizados 18 indivíduos de cada população, além das duas plantas mãe.

Os dados de presença (1) e ausência (0) de marcadores obtidos na análise de AFLP dos 74 indivíduos estudados permitiram o cálculo da similaridade genética entre todos os pares de genótipos. Para o cálculo da similaridade genética (S_{ij}), foi utilizado o coeficiente de Jaccard, conforme a equação: $S_{ij} = a / (a + b + c)$, onde, “ S_{ij} ” é a similaridade entre os pares de genótipos i e j , “ a ” é o número de fragmentos presentes em comum entre i e j , “ b ” é o número de fragmentos presentes em i e ausentes em j e “ c ” o número de fragmentos presentes em j e ausentes em i . Para análise, foram eliminados os marcadores que foram monomórficos para todos os 74 indivíduos.

Com base na matriz de similaridade gerada foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento da distância média (UPGMA – *Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Averages*). O ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r) (SOKAL; ROHLF, 1962).

Todas as análises descritas acima foram realizadas por meio do programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000).

A partir da matriz original gerada com os dados de presença e ausência de marcadores, em locos polimórficos, uma estimativa da variabilidade genética entre e dentro das populações foi estimada pela análise da variância molecular (AMOVA), usando o programa GENES (versão 2007.0.0.). A AMOVA calcula o valor F_{st} , que equivale à proporção da variação genética total fracionada entre populações (EXCOFFIER et al., 1992).

4.3 Resultados e Discussão

As três combinações de *primers* AFLP utilizadas amplificaram um total de 178 locos AFLP, dos quais 114 (64,0%) foram polimórficos entre todos os indivíduos estudados (Tabela 12). O número total de locos amplificados para cada combinação de *primers* variou entre 49 e 65, com um nível de polimorfismo entre 47,7% e 75,5%. Todos os locos analisados apresentaram peso molecular entre 100 e 500pb. Estes números estão próximos aos obtidos por Salgueiro et al. (2004), que obtiveram

78,05% de locos polimórficos analisando cinco populações de pitangueira de diferentes regiões (Rio de Janeiro, Pernambuco e Rio Grande do Sul). Margis et al. (2002), por sua vez, obtiveram 91,4% de locos polimórficos na avaliação de três populações desta espécie no Rio de Janeiro, com uma distância entre elas não superior a 30km. O número de locos amplificados por combinação de *primers* variou entre 42 e 61, muito próximo ao obtido por Margis et al. (2002), que observaram entre 42 e 65 locos por combinação.

Tabela 12 – Pares de *primers* utilizados no estudo, número de locos AFLP amplificados, número (Nº.P) e percentagem (%P) de polimorfismo encontrada para cada grupo (Gp52 e Gp15), e Nº.P e %P total (avaliando todos os indivíduos juntos).

Par de <i>primer</i> *	Gp52 (n = 37)		Gp15 (n = 37)		Total (n = 74)	
	Nº de locos	Nº.P / (%P)	Nº de locos	Nº.P / (%P)	Nº de locos	Nº.P / (%P)
P1	50	26 / (52,0%)	52	27 / (51,9%)	64	46 / (71,9%)
P2	61	21 / (34,4%)	56	18 / (32,1%)	65	31 / (47,7%)
P3	42	17 / (40,5%)	43	26 / (60,5%)	49	37 / (75,5%)
Total	153	64 / (41,8%)	151	71 / (47,0%)	178	114 / (64,0%)

* (P1) *Eco*+ACA – *Mse*+CTT; (P2) *Eco*+AGC – *Mse*+CTT; (P3) *Eco*+AAC – *Mse*+CAG.

Os resultados evidenciam a eficiência da técnica AFLP em detectar marcadores moleculares em pitangueira. Neste estudo, assim como em outros estudos (MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004), AFLP mostrou-se uma técnica confiável e eficiente na detecção de variação genética entre e dentro de populações. Esta técnica também vem sendo empregada com sucesso em diversas outras espécies (CARDOSO et al., 2000; DRUMMOND et al., 2000; LAURENTIN; KARLOVSKY, 2006; MWASE et al., 2006; AGRIMONTI et al., 2007; JACQUEMYN et al., 2007; WANG et al., 2007), pois além de gerar um grande número de marcadores, a técnica tem a vantagem de ser altamente reproduzível.

A percentagem de locos polimórficos nas populações de polinização livre foi ligeiramente maior do que nas populações de autopolinização (Tabela 13). Isto já era esperado, pois a autopolinização leva a um aumento de endogamia nas sucessivas gerações. Porém, as pequenas diferenças observadas entre as populações de autopolinização e de polinização livre (11,1% no Gp52 e 5,9% no Gp15 – Tabela 13) estão aquém do esperado, pois em populações de polinização

livre o esperado era que ocorresse maior polimorfismo. Isso deve estar ocorrendo devido a um elevado grau de parentesco entre plantas do banco de germoplasma de pitangueira da Embrapa Clima Temperado. Esse fator também explica o menor grau de polimorfismo encontrado em relação a outros trabalhos (MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004) com esta mesma espécie. Em populações ocorrendo em seu ambiente natural, a probabilidade de indivíduos geneticamente diferentes se cruzarem é maior, ocorrendo maior troca de genes entre plantas e conseqüentemente um maior fluxo gênico entre populações. Outra possibilidade para a ocorrência de baixa variabilidade entre plantas é a ocorrência de autofertilização nesta espécie, o que também contribuiria para diminuir os níveis de polimorfismo.

Tabela 13 – Número total de locos, número de polimorfismos e percentagem de polimorfismo para cada população de pitangueira analisada.

Mãe	Polinização	Nº. indivíduos	Nº. de locos	Nº. polimorfismos (% polimorfismo)
Gp52	Auto	18	153	41 (26,8%)
	Livre	18	153	58 (37,9%)
Gp15	Auto	18	151	56 (37,1%)
	Livre	18	151	65 (43,0%)

Os índices de similaridade obtidos reforçam estas duas possibilidades, elevado grau de parentesco entre plantas e autofertilização. Embora a análise de agrupamento (Figura 8) tenha separado claramente os indivíduos em dois grupos distintos (Gp52 e Gp15), dentro de cada grupo não ocorre uma separação clara entre populações, inclusive com plantas de polinização livre no GP52 (por exemplo: L_15 e L_12) sendo observadas mais próximas da planta mãe (Pit 52) do que algumas plantas de autopolinização. A similaridade entre os dois grupos foi de aproximadamente 48%, com um coeficiente de correlação cofenética (r) de 0,96, o que evidencia um bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias no dendrograma e a sua matriz original. A partir da matriz de similaridade, foi obtida a similaridade média entre todos os indivíduos analisados, que ficou em 60,4%.

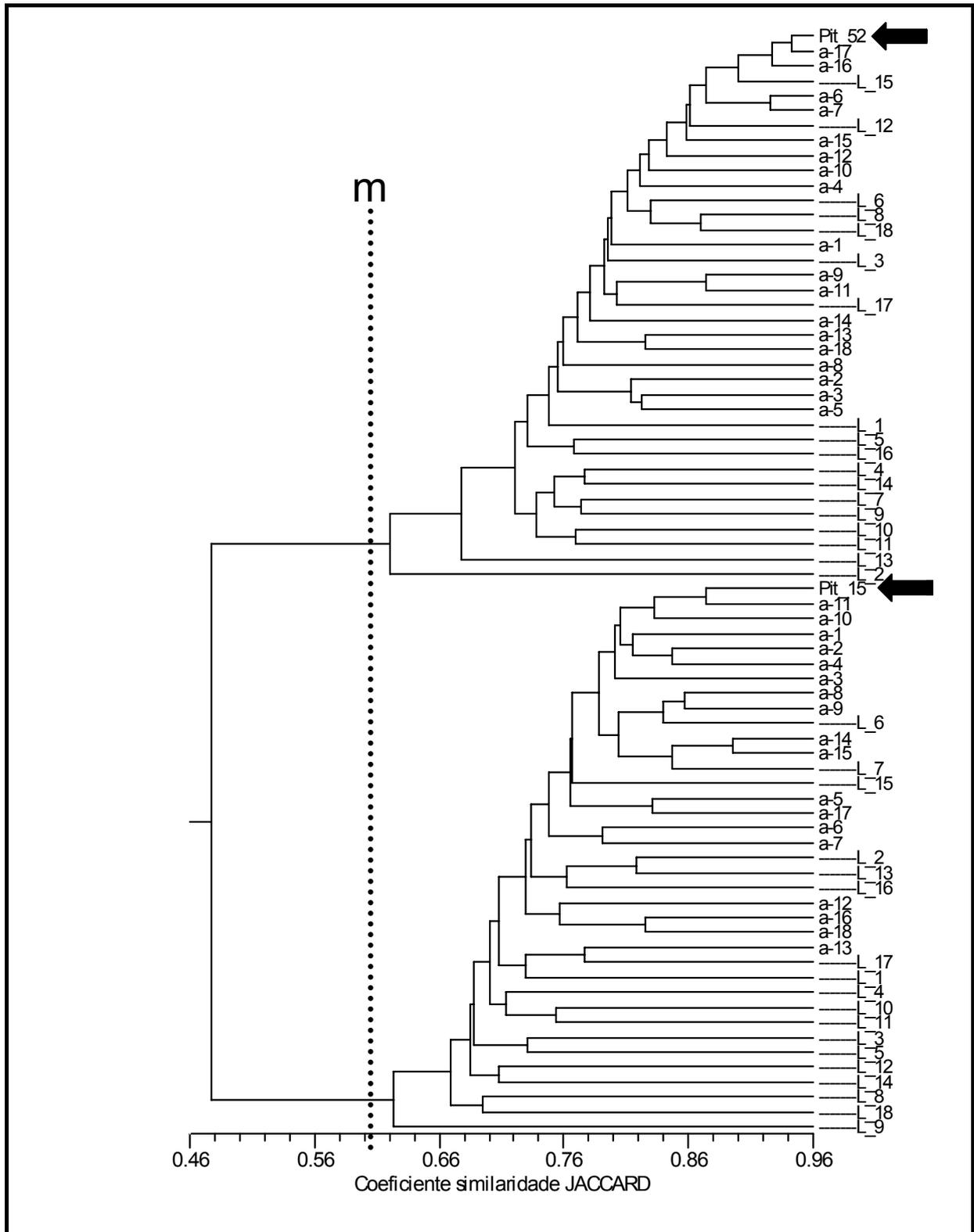


Figura 8 – Dendrograma representando a similaridade genética entre 74 plantas de pitangueira, a partir de 114 marcadores AFLP, com base no coeficiente de Jaccard, utilizando o método UPGMA. Coeficiente de correlação cofenética ($r=0,96$). Setas indicam as plantas mães (seleções “Pit 52” e “Pit 15”). (a) = indivíduo originado por autopolinização; (L) = indivíduo obtido por polinização livre; (m) = similaridade média entre todos os indivíduos.

Embora não seja possível visualizar uma separação clara entre plantas oriundas de autopolinização daquelas de polinização cruzada, observa-se uma tendência de agrupamento, com plantas oriundas de autopolinização sendo mais similares entre elas e com a planta mãe do que com as plantas de polinização livre (Figura 8). Quando os dados foram analisados separadamente para cada grupo (dendrogramas não apresentados), a estrutura hierárquica das populações permaneceu inalterada e, observou-se a mesma tendência de agrupamento.

A partir da matriz de similaridade também foram obtidos os índices de similaridade média para cada grupo (Gp52 e Gp15) e para cada população dentro do grupo. A similaridade média geral entre todos os indivíduos pertencentes ao grupo Gp52 foi 75,1%, enquanto que para o Gp15 foi de 71,6%. Entre plantas autopolinizadas, a similaridade média no Gp52a foi de 78,9%, e no Gp15a foi de 73,7%. Já, entre plantas de polinização livre foi de 75,3% no Gp52L e de 69,0% no Gp15L.

Os resultados da análise da variância molecular (AMOVA) (Tabela 14) mostram que a maior variação está presente dentro das populações de pitangueira avaliadas. Porém, os valores de variação encontrados entre populações, embora baixos, foram altamente significativos. No grupo Gp52, o F_{st} estimado ($F_{st} = 0,1336$), indica que 86,64% da variação total está presente dentro das populações, e 13,36% entre. No grupo Gp15, o F_{st} estimado ($F_{st\ Gp15} = 0,061$) indica que 93,9% da variação está presente dentro das populações, e apenas 6,1% entre elas. Maior variação dentro de populações desta espécie também foi observada em trabalhos anteriores (MARGIS et al., 2002; SALGUEIRO et al., 2004). Entretanto, de acordo com Ouborg et al. (1999), uma variação significativa entre populações pode indicar restrito fluxo de genes.

No presente trabalho, esse resultado era esperado, pois as populações analisadas têm a mesma origem materna, o que reduz a diferença entre elas, dentro de cada grupo (Gp52 e Gp15). No entanto, no trabalho de Salgueiro et al. (2004), a variabilidade observada dentro de populações (78,9%) foi maior do que o esperado, uma vez que as populações analisadas estavam a uma distância de pelo menos 99km uma da outra e não existia interação entre elas. Os autores atribuem essa variabilidade a interações (fluxo gênico) ocorridas no passado. Margis et al. (2002), por sua vez, observaram 88% da variabilidade dentro das populações, e sugerem que ocorra um intenso fluxo de genes entre elas, uma vez que se encontram a uma

distância não superior a 30km uma da outra. Porém, estes mesmos autores destacam que o grau de diferenciação populacional observado foi maior do que o esperado para uma espécie com pequenas distâncias entre populações, e sugerem que as mesmas estariam sendo influenciadas por diferentes graus de impacto humano, por meio da fragmentação da mata, o que estaria reduzindo o número de indivíduos ou, ainda, obstruindo o fluxo contínuo de pólen e sementes. De acordo com revisão de Wang et al. (2007), a diferenciação genética entre populações é função do fluxo de genes entre elas, principalmente via dispersão de pólen e sementes. Estes autores observaram que, em *Musa balbisiana*, uma espécie de banana selvagem na China, a AMOVA detectou 27% de diferenciação populacional, e apontam como principais motivos para esta diferenciação a super-exploração das florestas pelo homem, o que estaria reduzindo consideravelmente a população e atuação dos polinizadores, principalmente abelhas e morcegos, bem como a dispersão de sementes por roedores, o que contribui para a restrição do fluxo de genes e aumenta a probabilidade que indivíduos mais aparentados se cruzem.

Tabela 14 – Análise da variância molecular (AMOVA) em dois grupos (Gp52 e Gp15) de plantas de pitangueira. Cada grupo é formado por 36 indivíduos, divididos em duas populações. GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrados médios.

Grupo	Fonte de variação	GL	SQ	QM	Componente de variância	Total (%)
Gp52	Entre populações	1	32,028	32,028	1,3079	13,36**
	Dentro de populações	34	288,5	8,485	8,4853	86,64**
	Total	35	320,52	9,158	9,7932	100,0
$F_{st} = 0,1336^{**}$						
Gp15	Entre populações	1	21,889	21,889	0,6554	6,1**
	Dentro de populações	34	343,11	10,092	10,0915	93,9 ^{ns}
	Total	35	365,0	10,429	10,7469	100,0
$F_{st} = 0,061^{**}$						

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro.

No entanto, o grau de diferenciação populacional observado em pitangueira por Margis et al. (2002) pode ser também devido à ocorrência de determinada taxa de autopolinização ou autofertilização ao longo do tempo. Considerando-se que as populações estavam isoladas e com restrição de fluxo de genes entre elas, a

autopolinização poderia estar aumentando a frequência de genes raros em alguma das populações, o que contribuiria para esta diferenciação. Assim, este fator, juntamente com os fatores por eles discutidos, pode estar ocasionando aumento de endogamia e, conseqüentemente, maior diferenciação genética.

A possibilidade de aumento de endogamia por autopolinização é levantada em outras espécies. Em *Myrtus communis*, uma Myrtaceae típica da flora Mediterrânea, Agrimonti et al. (2007) relatam heterozigosidade menor do que o esperado para uma espécie que, tudo indica, é de polinização cruzada. Os autores levantam a hipótese de que a estrutura da flor desta espécie, que é hermafrodita, favoreça certo grau de autopolinização. O mesmo acontece em *Syzygium nervosum*, uma Myrtaceae de polinização cruzada endêmica da Austrália (SHAPCOTT, 1999). Porém, neste caso a perda de heterozigosidade é explicada pela estrutura das populações, que são compostas de indivíduos geneticamente muito próximos, e isolados de outros indivíduos da mesma espécie pela vegetação, limitando o fluxo de pólen a maiores distâncias e facilitando a autopolinização ou cruzamento entre estes indivíduos geneticamente mais próximos.

Valores de F_{st} entre 0,05 e 0,15 sugerem moderada diferenciação genética entre populações (Wright, 1978 *apud* Mwase et al., 2006). Os valores F_{st} observados no presente trabalho, nos dois grupos de plantas ($F_{st \text{ Gp52}} = 0,1336$; $F_{st \text{ Gp15}} = 0,061$), estão dentro desta faixa. No entanto, pode-se inferir que esta diferenciação só não foi mais acentuada devido à ocorrência de certa taxa de autofertilização, ou ainda polinização com pólen de indivíduos muito próximos geneticamente (aparentados), nas plantas de polinização livre. Isso é corroborado com a visualização do dendrograma, onde as populações dentro dos grupos são próximas, não havendo uma separação clara entre elas, conforme já discutido.

De fato, as plantas mães utilizadas neste trabalho (“Pit 15” e “Pit 52”) têm a mesma origem, bem como as plantas vizinhas a elas, o que resulta em aumento de endogamia a cada nova geração. A planta “Pit 15” foi selecionada a partir de *seedlings* obtidos de sementes coletadas de uma única planta em propriedade particular no interior do município de Pelotas, RS. Já, a planta “Pit 52” foi selecionada de *seedlings* obtidos a partir de sementes coletadas da população F1 introduzida, tratando-se, portanto, de uma planta F2. A variabilidade quanto a caracteres morfológicos nestas populações leva a crer que a planta mãe da qual foram coletadas as primeiras sementes era altamente heterozigota. Essa

observação é reforçada pelos índices de similaridade e valores F_{st} obtidos, que demonstram aumento de endogamia na população F2, ou seja, nas populações do Gp52.

Outras possíveis causas desta baixa variabilidade são o pequeno tamanho de população utilizado ($N = 18$) e o fato de apenas três combinações de *primers* terem sido utilizadas. Margis et al. (2002) observam que a robustez da análise da diversidade entre e dentro das populações de pitangueira por eles avaliadas aumenta progressivamente com a adição de pares de *primers*, e concluem que isto provavelmente ocorra porque as populações são muito próximas. Por outro lado, um pequeno número de marcadores e combinações de *primers* são necessários para distinguir populações ou variedades menos próximas (ZHU et al., 1998).

Os resultados obtidos por Salgueiro et al. (2004) indicam uma considerável diferenciação entre as cinco populações de pitangueira avaliadas ($F_{st} = 0,211$). Levando-se em consideração o elevado índice de fragmentação que as matas nativas vêm sofrendo nas diferentes regiões do país, pode-se concluir que populações desta espécie, ao ficarem isoladas uma da outra, se diferenciam ao longo do tempo, pelo aumento da frequência de alelos raros em diferentes populações. No presente estudo, quando se compara as populações em pares (Tabela 15), a AMOVA mostra que a maior parte da variação esta entre as populações. Analisando as duas populações oriundas de autopolinização, o valor F_{st} estimado ($F_{st} = 0,6293$) indica que a percentagem da variação total residente entre as populações é 62,93%.

Tabela 15 – Resumo da AMOVA. Percentagem da variação total observada entre populações.

Populações	52 auto	52 livre	15 auto	15 livre
52 auto	--	13,36**	62,93**	57,48**
52 livre		--	59,23**	53,52**
15 auto			--	6,10**
15 livre				--

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro.

Quando se compara as duas populações oriundas de polinização livre, o $F_{st} = 0,5352$ indica que também ocorre uma grande diferenciação genética entre elas, o que não seria o esperado em populações oriundas de acasalamento ao acaso, considerando a ocorrência de polinização cruzada. Entretanto, muito pouco se conhece sobre o modo de reprodução da pitangueira, incluindo modo de polinização, bem como dispersão de pólen e sementes. A falta de informações desta natureza não é exclusividade desta espécie, e também é relatada por Proença e Gibss (1994) para outras espécies de Myrtaceae que ocorrem no Brasil. Além disso, sabe-se que para outras espécies desta família nativas no Sul do Brasil, tais como uvalheira (*E. pyriformis*), cerejeira-do-mato (*E. involucrata*), guabirobeira (*Campomanesia* sp), dentre outras, as informações são escassas.

Nas populações de pitangueira estudadas, algumas características, além dos fatores já mencionados, levam a acreditar numa diferenciação populacional pelo aumento de endogamia por autofertilização. Esta hipótese é sustentada pelo padrão de floração da pitangueira, classificado como do tipo *big-bang*, ou floração em massa (LUGHADHA; PROENÇA, 1996), que se caracteriza por apresentar grande produção de flores em curto espaço de tempo (SILVA; PINHEIRO, 2007). De acordo com O'Brien e Calder (1993), essa característica pode ser uma estratégia para atrair polinizadores. Em espécies autocompatíveis que necessitam a ação de polinizadores para uma maior taxa frutificação, a floração em massa pode ser uma estratégia para promover a autofertilização (BEARDSELL et al., 1993), pois além de atrair polinizadores, faz com que os mesmos permanecem mais tempo forrageando na mesma planta. Assim, de acordo com Silva (2006), a produção de frutos em pitangueira pode ocorrer por geitonogamia, aquela em que ocorre polinização com a transferência de pólen entre flores da mesma planta, embora a produção de frutos por autopolinização passiva possa ocorrer.

Os resultados de frutificação obtidos no capítulo 2 demonstram que mesmo em ramos ensacados com TNT houve frutificação na ordem de 6,4%. Aliado a isso, as observações sobre crescimento dos tubos polínicos no interior do pistilo das flores, também no capítulo 2, demonstram que a pitangueira não é uma espécie auto-incompatível, bem como o fato de se ter obtido as populações por autopolinização para a realização deste trabalho. Estudos mais detalhados sobre sua biologia reprodutiva, bem como características anatômicas das flores, devem ser conduzidos para determinar como ocorre a polinização, dispersão do pólen e

sementes, e estruturação de populações, a fim de determinar a melhor maneira de conservação genética da espécie. Também, o uso de marcadores genéticos codominantes pode fornecer maiores informações sobre os índices de polinização cruzada e de autopolinização, bem como melhores esclarecimentos sobre a estimativa do fluxo de genes, uma vez que o caráter dominante do AFLP impede que sejam diferenciados locos homozigotos dominantes de locos heterozigotos, subestimando, assim, a frequência dos alelos recessivos.

Em termos de preservação da espécie, a existência de diferenciação populacional relatada em trabalhos anteriores encontrados na literatura, associada com a hipótese de que ocorra uma taxa de autofertilização considerável, indica que mais populações existentes nos fragmentos de mata original devem ser conservadas para assegurar variabilidade suficiente. Em relação ao BAG de fruteiras nativas da Embrapa Clima Temperado, a maioria das plantas de pitangueira existentes hoje tem a mesma origem, e poucas plantas foram introduzidas de outras regiões, como Paraná, Santa Catarina e região do Cerrado. Assim, torna-se necessário novas coletas e introdução de material. Essa coleta deveria ser feita em vários locais de várias regiões, a fim de aumentar e preservar grande variabilidade para futuro, principalmente quando se pensa em desenvolver um programa de melhoramento genético.

4.4 Conclusões

Nas condições em que foram realizados os trabalhos, conclui-se que:

- Marcadores AFLP foram apropriados para o estudo da variabilidade genética entre e dentro de populações de pitangueira.
- Houve maior polimorfismo de marcadores AFLP em populações de polinização livre.
- A pitangueira produz frutos tanto por autofertilização quanto por polinização cruzada.
- A proporção da variabilidade genética total entre populações foi significativa, embora tenha sido menor do que aquela observada dentro das populações.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Muito se fala no potencial de utilização de espécies nativas nos sistemas de produção, nas diversas Regiões do Brasil. No Sul do país existem muitas espécies que poderiam ser exploradas economicamente, dentre elas a pitangueira. No entanto, na prática são poucos os resultados positivos e promissores. Isso se deve, em grande parte, a falta de conhecimento sobre as espécies nativas de modo geral. Um outro aspecto, ainda mais importante, é a preocupação com a preservação da biodiversidade. Durante muito tempo o incentivo à preservação e ao estudo de espécies endêmicas ficou renegado a um segundo plano. Porém, nos últimos anos, maiores incentivos e esforços vêm sendo direcionados para este fim.

Assim, uma das preocupações para com as espécies nativas, sejam elas fruteiras ou não, é a preservação da variabilidade, pois o ritmo acelerado de desmatamento, principalmente nas áreas de expansão agrícola e de urbanização nos arredores das grandes cidades, ameaça muitas espécies com o risco de extinção. Em alguns países existem exemplos de como estes fatores ocasionaram perda irreversível de variabilidade. Segundo Drummond et al. (2000), *Metrosideros bartlettii* (Myrtaceae), uma espécie endêmica da Nova Zelândia, e extremamente rara, foi descoberta em 1975. Quando da publicação do trabalho, apenas 31 indivíduos eram conhecidos. Porém, os autores destacam que esta espécie originalmente formava uma mega-população, e que os indivíduos remanescentes são resultado da contração da população, ocorrendo hoje apenas em fragmentos de *habitat* viável a sua ocorrência. Essa devastação foi em decorrência da colonização da região, e conseqüente fragmentação da floresta.

Conhecimentos básicos sobre o modo de reprodução, dispersão do pólen e sementes, distribuição da variabilidade, agentes polinizadores, dentre outros, essenciais para auxiliar nos trabalhos de preservação, são raros para espécies autóctones.

Por outro lado, quando a finalidade é a exploração econômica, outros fatores também são importantes. Conforme relatado neste trabalho, um método adequado de propagação vegetativa, visando a formação de pomares uniformes e de qualidade, bem como o início de trabalhos de melhoramento genético são fundamentais.

Os resultados aqui apresentados põem em evidência que é possível a propagação vegetativa da pitangueira. A enxertia de garfagem, na saída do inverno, proporcionou índices de pegamento na ordem de 80%. Na região nordeste do Brasil, trabalhos anteriores (BEZERRA et al., 1999, 2002) já demonstravam a eficiência desta alternativa para a produção de mudas. No entanto, de acordo com estes autores, pomares de pitangueira são instalados com mudas produzidas a partir de sementes. Essa alternativa não é a mais recomendada, pois a variabilidade encontrada entre as mudas reflete em desuniformidade no pomar e conseqüentemente no produto final e dificulta o manejo.

Assim, o uso da enxertia de garfagem na produção de mudas de pitangueira abre novas perspectivas para os trabalhos com essa fruteira nativa. Acredita-se que, em breve, algumas seleções existentes na Embrapa Clima Temperado poderão ser testadas para serem propagadas como cultivares, proporcionando aos agricultores da região uma nova oportunidade de diversificação da produção e aumento na renda, principalmente na pequena propriedade familiar, forte característica no meio rural na região.

Em relação ao modo de reprodução, ficou demonstrado que a espécie não é auto-incompatível, pois o pólen germina normalmente, e os tubos polínicos crescem sem anomalias ao longo do estilo. No entanto, é necessário elucidar os processos que ocorrem após a entrada dos tubos no ovário, principalmente os fatores envolvidos no direcionamento dos tubos polínicos para a entrada do óvulo e a conseqüente fertilização. A incógnita da degeneração dos óvulos continua aguçando a curiosidade, pois, apesar da grande quantidade de óvulos existentes no ovário da flor da pitangueira, apenas uma ou duas sementes são formadas. Esta grande

quantidade de óvulos, aliás, foi o maior empecilho para elucidar esta etapa do processo de reprodução da espécie.

A autocompatibilidade ficou evidente com a obtenção de mudas a partir de sementes coletadas de frutos produzidos por autopolinização manual, que originaram as populações de autopolinização utilizadas no capítulo 3 do presente estudo. Isso sugere que, se pensarmos em implantar um pomar comercial, não é necessário a utilização de variedades polinizadores.

Também fica claro que, apesar de não apresentar auto-incompatibilidade, é necessária a presença de agentes polinizadores para uma boa frutificação. Pelas observações feitas até o momento, apesar de não terem sido sistematizadas cientificamente, os principais agentes polinizadores são as abelhas melíferas. Assim, a criação de abelhas para a produção de mel pode ser uma atividade paralela à produção de pitangas, o que agregaria mais uma fonte de renda ao pequeno produtor.

A autofecundação, por outro lado, implica em aumento de endogamia, que por sua vez ocasiona diferenciação populacional. Para a preservação da espécie em populações naturais, a existência de diferenciação populacional sugere que mais populações devam ser conservadas para assegurar maior variabilidade. Em se tratando de conservação *ex situ*, em bancos de germoplasma, a coleta de material deve respeitar o mesmo raciocínio, ou seja, a coleta deve ser realizada em várias populações, e de várias plantas de cada população a ser amostrada. Conforme já destacado, atenção especial deve ser dada a populações que estão próximas a áreas urbanas e de expansão de fronteiras agrícolas, pois a constante intervenção humana pode ocasionar perda definitiva de alelos raros.

REFERÊNCIAS

AGRIMONTI, C.; BIANCHI, R.; BIANCHI, A.; BALLERO, M.; POLI, F.; MARMIROLI, N. Understanding biological conservation strategies: a molecular-genetic approach to the case of myrtle (*Myrtus communis* L.) in two Italian regions: Sardinia and Calabria. **Conservation Genetics**, Heidelberg, v.8, n.2, p.385-396, 2007.

ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V.U. **As Frutas Silvestres Brasileira**. Rio de Janeiro: Globo Rural, 1988, 203p.

ARADHYA, M.K.; WEEKS, C.; SIMON, C.J. Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.103, n.1, p.131-144, 2004.

ARATHI, H.S.; GANESHIAH, K.N.; SCHAANKER R.U.; HEGDE S.G. Factors affecting embryo abortion in *Syzygium cumnii* (L.) skeels (Myrtaceae). **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.157, n.1, p.49-52, 1996.

ARAÚJO, F.P.; CASTRO NETO, M.T. Influência de fatores fisiológicos de plantas-matrizes e de épocas do ano no pegamento de diferentes métodos de enxertia do umbuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.752-755, 2002.

ARBELOA, A.; HERRERO, M. Development of the ovular structures in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). **New Phytologist**, Oxford, v.118, n.4, p.527-533, 1991.

ARBELOA, A.; HERRERO, M. Valoracion de la translocation al ovulo y de la esterilidad femenina en melocotonero. **Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei**, Zaragoza, v.17 n.3-4, p.214-220, 1985.

BASTOS, D.C.; SCARPARE FILHO, J.A.; PIO, R.; LIBARDI, M.N.; ALMEIDA, L.F.P. Desenvolvimento inicial de mudas enxertadas e de estacas de caramboleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.2, p.338-340, 2005.

BEARDSELL, D.V.; O'BRIEN, S.P.; WILLIAMS, E.G.; KNOX, R.B.; CALDER, D.M. Reproductive biology of Australian Myrtaceae. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.41, n.4-5, p.511-526, 1993.

BELLINI, E.; GIORDANI, E.; NENCETTI, V.; PAFFETTI, D. Genetic relationships in japonese plum cultivars by molecular markers. **Acta Horticulturae**, Warszawa, v.478, p.53-59, 1998.

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

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

BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E.; PEDROSA, A.C.; DANTAS, A.P.; FREITAS, E.V.de. Performance of surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) in Pernambuco, Brazil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.370, p.77-81, 1995.

BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E.; SILVA JUNIOR, J.F.da.; ALVES, M.A. Comportamento da pitangueira (*Eugenia uniflora* L) sob irrigação na região do Vale do Rio Moxotó, Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.177-179, 2004.

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

BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C.; SCHUCH, M.W. RAPDs na caracterização genético molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de ameixeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.272-274, 2003.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2ª ed. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 453p. 1998.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v.32, n.3, p.314-331, 1980.

BRETÓ, M.P.; RUIZ, C.; PINA, J.A.; ASINS, M.J. The Diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a Vegetatively Propagated Crop Species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, v.21, n.2, p.285-293, 2001.

BREYNE, P.; ROMBANT, D.; VAN GYSEL, A.; VAN MONTAGU, M.; GERATS, T. AFLP analysis of genetic diversity within and between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. **Molecular and General Genetics**, New York, v.261, n.4-5, p.627-634, 1999.

BURD, M. Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. **Botanical Review**, Bronx, v.60, n.1, p.83-139, 1994.

CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; BARBOSA, W.; SABINO, J.C.; RIGITANO, O. Exxertia precoce da noqueira-macadâmia. **Bragantia**, Campinas, v.47, n.2, p.195-211, 1988.

CARDOSO, S.R.S.; ELOY, N.B.; PROVAN, J.; CARDOSO, M.A.; FERREIRA, P.C.G. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v.9, n.11, p.1753-1760, 2000.

CASPER, B.B.; WIENS, D. Fixed rates of random ovule abortion in *Crytantha flava* (Boraginaceae) and its possible relation to seed dispersal. **Ecology**, Durham, v.62, n.3, p.866-869, 1981.

CASSAS, A.M.; IGARTUA, E.; BALAGUER, G.; MORENO, M.A. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. **Euphytica**, Netherlands, v.110, n.1, p.139-149, 1999.

CASTRO, C.M.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; MAIA, M.S.; MATTOS, L.A.; FREITAS, F. Morphological and molecular characterization of italian ryegrass populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.3, n.4, p.245-254, 2003.

CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; SANCHA, J.C.; TODA, F.M.; ZAPATER, J.M.M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.97, n.1-2, p.51-59, 1998.

CHARLESWORTH, D. Why do plants produce so many more ovules than seeds? **Nature**, London, v.338, p.21-22, 1989.

CHEUNG, A.Y. Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. **Trends in Plant Science**, London, v.1, n.2, p.45-51, 1996.

CLIFFORD, S.C.; SEDGLEY, M. Pistil structure of *Banksia menziesii* R. Br. (Proteaceae) in relation to fertility. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.41, n.4-5, p.481-490, 1993.

COSTA, Itayguara Ribeiro da. **Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil**. 2004. 89f. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v.19, n.4, p.299-306, 2001.

CURRIER, H.B. Callose substance in plant cells. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 44, n.6, p.478-488, 1957.

DAHL, A.E.; FREDRIKSON, M. The timetable for development of maternal tissues sets the stage for male genomic selection in *Betula Pendula* (Betulaceae). **American Journal of Botany**, Bronx, v.83, n.7, p.895-902, 1996.

DAVIES JUNIOR, F.T.; HAMBRICK, C.E.; FANN, Y.; PEMBERTON, N.B. Grafting and adventitious root formation of Texas field rose bushes. **Acta Horticulturae**, Leuven, n.189, p.89-100, 1986.

DETTORI, M.T.; PALOMBI, M.A. Identification of *Feijoa sellowiana* Berg accessions by RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.86, n.4, p.279-290, 2000.

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

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

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v.12, p.13-15, 1987.

DRUMMOND, R.S.M.; KEELING, D.J.; RICHARDSON, T.E.; GARDNER, R.C.; WRIGHT, S.D. Genetic analysis and conservation of 31 surviving individuals of a rare New Zealand tree, *Metrosideros bartlettii* (Myrtaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v.9, n.8, p.1149-1157, 2000.

DUARTE, O.R.; FACHINELLO, J.C.; SANTOS FILHO, B.G. Multiplicação da goiabeira serrana através de estacas semilenhosas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p.513-516, 1992.

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira Serrana (*Feijoa sellowiana*)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 66p. (Série Frutas Nativas, 5).

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W.; RASEIRA, M.C.B.; VIGHI, I.L.; ROCHA, P.S.G.; WENDT, S.N. Viabilidade de marcadores moleculares RAPD na avaliação da diversidade genética em plantas de araçazeiro. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.8, n.2, p.101-106, 2003.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial-DNA restriction data. **Genetics**, Maryland, v.131, n.2, p.479-491, 1992.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221p.

FEREIRA, M.E.; MORETZSOHN, M.C.; BUSO, G.S.C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.377-420.

FERREIRA, D.F. **Manual do sistema SISVAR para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. 66p.

FERREIRA, E.M.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; LEITE, H.G.; SARTORIO, R.C.; PENCHEL FILHO, R.M. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.2, p.183-187, 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p.

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.1, p.167-171, 1995.

FRANZON, R.C.; GONÇALVES, R.S.; CARPENEDO, S.; ANTUNES, L.E.C. Testes de propagação de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) através de mini-estacas tratadas com BAP e AIB. In: 11º. CONGRESO NACIONAL DE HORTIFRUTICULTURA, 3º. CONGRESO PANAMERICANO DE PROMOCIÓN DEL CONSUMO DE FRUTAS Y VERDURAS, 2007, Montivideo. **Anais do....** Montivideo: Sociedade Uruguaya de Hortifruticultura, 2007. Trabalho 136. Cd room.

FRANZON, R.C.; RASEIRA, M.C.B.; WAGNER JÚNIOR, A. Testes de germinação *in vitro* e armazenamento de pólen de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.29, n.2, p.251-255, 2007.

FRANZON, RC.; RASEIRA, M.C.B. Características fenológicas e morfológicas, floração e maturação dos frutos de mirtáceas frutíferas nativas do Sul do Brasil. In: RASEIRA, M.C.B.; ANTUNES, L.E.C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E.D. **Espécies Frutíferas Nativas do Sul do Brasil** (Documentos, 129). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.27-46.

FRANZON, RC.; RASEIRA, M.C.B.; CORRÊA, E.R. Potencialidades agrônômicas de algumas mirtáceas frutíferas nativas do Sul do Brasil. In: RASEIRA, M.C.B.; ANTUNES, L.E.C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E.D. **Espécies Frutíferas Nativas do Sul do Brasil** (Documentos, 129). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.99-106.

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

GAMA, F.S.N. da; KIST, H.G.; ACCORST, M.R. Efeito da época de enxertia e do tipo de garfo sobre o pegamento de enxertos de goiabeira (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.11, n.2, p.45-47, 1989.

GANESHIAH, K.N.; SHAANKER, R.U. Seed abortion in wind-dispersal pods of *Dalbergia sissoo*: maternal regulation or sibling rivalry? **Oecologia**, Berlin, v.77, n.1, p.135-139, 1988.

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

GREGOR, D.; HARTMANN, W.; STÖSSER, R. Cultivar identification in *Prunus domestica* using random amplified polymorphic DNA markers. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.259, p.33-40, 1994.

HARTMANN, N.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T. **Plant propagation: principles and practices**. 5^a ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 647p.

HAUPT, A.W. A gelatin fixative for paraffin sections. **Stain Technology**, Baltimore, v.5, p.97-98, 1930.

HERRERO, M. From pollination to fertilization in fruit trees. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v.11, n.1, p.27-32, 1992.

HERRERO, M. Male and female synchrony and the regulation of mating in flowering plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v.358, p.1019-1024, 2003.

HERRERO, M.; ARBELOA, A. Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). **American Journal of Botany**, Bronx, v.76, n.10, p.1441-1447, 1989.

HERRERO, M.; DICKINSON, H.G. Pollen-Pistil Incompatibility In *Petunia Hybrida* - Changes In The Pistil Following Compatible And Incompatible Intraspecific Crosses. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v.36, p.1-18, 1979.

HERRERO, M.; DICKINSON, H.G. Pollen-tube growth following compatible and incompatible intraspecific pollinations in *petunia-hybrida*. **Planta**, New York, v.148, n.3, p.217-221, 1980.

HERRERO, M.; HORMAZA, J.I. Pistil strategies controlling pollen tube growth. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v.9, n.6, p.343-347, 1996.

HESLOP-HARRISON, Y. Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. **Annals of Botany**, London, v.85, (Supplement A), p.5-13, 2000.

HESLOP-HARRISON, Y; SHIVANNA, K.R. The receptive surface of the angiosperm stigma. **Annals of Botany**, London, v.41, n.6, p.1233-1258, 1977.

HOWPAGE, D.; VITHANAGE, V.; SPOONER-HART, R. Pollen tube distribution in the kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev. C. F. Liang) pistil in relation to its reproductive process. **Annals of Botany**, London, v.81, n.6, p.697-703, 1998.

JACOBINO, A.P.; MINIMI, K.; KLUGE, R.A.; KISHINO, A.Y. Métodos de proteção de enxerto na produção de mudas de mangueira, abacateiro e noqueira-macadâmia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.10, p.1985-1990, 2000.

JACQUEMYN, H.; VANDEPITTE, K.; BRYN, R.; HONNAY, O.; ROLDÁN-RUIZ, I. Fitness variation and genetic diversity in small, remnant populations of the food deceptive orchid *Orchis purpurea*. **Biological Conservation**, Essex, v.139, n.1-2, p.203-210, 2007.

JENSEN, W.A. **Botanical Histochemistry. Principles and Practice**. Freeman, W. H. Company: San Francisco, Califórnia, Estados Unidos. 1962.

JOHRI, B.M.; SRIVASTAVA, P.S.; SINGH, N. Reproductive biology of angiosperms. In: JOHRI, B.M.; SRIVASTAVA, P.S. **Reproductive Biology of Plants**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2001. p.237-272.

KITAMURA, M.C.; LEMOS, E.E.P. Enxertia precoce da gravioleira (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.186-188, 2004.

KITAMURA, M.C.; RAMOS, J.D.; LEMOS, E.E.P. Avaliação de tipos de enxertia e recipientes para produção de mudas de gravioleira (*Annona muricata* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.1, p.24-33, 2004.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: An illustrated synoptic and identification keys. **Brittonia**, New York, v.49, n.4, p.508-536, 1997.

LAURENTIN, H.E.; KARLOVSKY, P. Genetic relationship and diversity in a sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm collection using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **BMC Genetics**, London, v.7, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/7/10>>. Acesso em: 02/04/2008.

LEONEL, S.; VARASQUIM, L.T.; RODRIGUES, J.D.; et al. Efeito da aplicação de fitorreguladores e ácido bórico em estacas de jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora* Berg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.13, n.3, p.219-222, 1991.

LINSKENS, H.F.; ESSER, K. Über eine spezifische Anfärbung der Pollen-shläuche und die Zähl Kallosapropten nach selbstung und fremdung. **Naturwissenschaften**, Heidelberg, v.44, p.16, 1957.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v.44, n.3, p.397-401, 1989.

LLOYD, D.G.; SCHOEN, D. Self and cross-fertilization in plants. I – Functional dimensions. **Internacional Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.153, n.3, p.358-369, 1992.

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.

MAHORO, S. Effects of flower and seed predators and pollinators on fruit production in two sequentially flowering congeners. **Plant Ecology**, Dordrecht, v.166, n.1, p.37-48, 2003.

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

MARGIS, R.; FELIX, D.; CALDAS, J.F.; SALGUEIRO, F.; ARAÚJO, D.S.D.; BREYNE, P.; VAN MONTAGU, M.; OLIVEIRA, D.DE; MARGIS-PINHEIRO, M. Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. **Biodiversity and Conservation**, London, v.11, n.1, p.149-163, 2002.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: issue, ontogenetic and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.45, n.5, p.753-763, 1959.

MARSHALL, D.L.; ELLSTRAND, N.C. Effective mate choice in wild radish: evidence for selective seed abortion and its mechanism. **American Naturalist**, Chicago, v.131, n.5, p.739-756, 1988.

MAUÉS, M.M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.25, n.4, p.441-448, 2002.

MEHLENBACHER, S.A. Classical and molecular approaches to breeding fruit and nut crops for disease resistance. **Hortscience**, Alexandria, v.30, n.3, p.466-477, 1995.

MERWE, M.M.; WYK, A.E.; BOTHA, A.M. Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern Africa taxa. **Plant Systematic and Evolution**, New York, v.251, n.1, p.21-34, 2005.

MINDÉLLO NETO, U.R.; TORRES, A.N.L.; HIRANO, E.; BALBINOT JÚNIOR, A.A.; BREY, I.O.; PETERS, E. Influência da proteção do enxerto na produção de mudas de abacate. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.189-190, 2004.

MOGENSEN, H.L. Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae). **American Journal of Botany**, Bronx, v.62, n.2, p.160-165, 1975.

MWASE, W.F.; BJORNSTAD, A.; STEDJE, B.; BOKOSI, J.M.; KWAPATA, M.B. Genetic diversity of *Uapaca kirkiana* Muel. Arg. populations as revealed by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.5, n.13, p.1205-1213, 2006.

O'BRIEN, S.P. Pistil structure and pollen tube pathways in *Leptospermum myrsinoides* and *L. continentale* (Myrtaceae). **Annals of Botany**, London, v.73, n.3, p.225-230, 1994.

O'BRIEN, S.P. Timetable of stigmatic receptivity and development and pollen tube growth in *Chamelacium uncinatum* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.44, n.6, p.649-659, 1996.

O'BRIEN, S.P.; CALDER, D.M. Reproductive-biology and floral phenologies of the sympatric species *Leptospermum myrsinoides* and *L. continentale* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.41, n.4-5, p.527-539, 1993.

OUBORG, N.J.; PIQUOT, T.; GROENENDAEL, M.V. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, Durham, v.87, n.4, p.551-568, 1999.

PALSER, B.F.; ROUSE, J.L.; WILLIAMS, E.G. Aberrant ovules and megagametophytes in *Rhododendron nuttallii* (Ericaceae). **Botanical Gazette**, Chicago, v.151, n.1, p.73-87, 1990.

PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake por meio de marcador molecular RAPD. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.60, p.119-133, 2001.

PIMIENTA, E.; POLITO, V. Ovule abortion in 'Nonpareil' almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb). **American Journal of Botany**, Bronx, v.69, n.6, p.913-920, 1982.

POUND, L.M.; PATTERSON, B.; WALLWORK, M.A.B.; POTTS, B.M. E SEDGLEY, M. Pollen competition does not affect the success of self-pollination in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.51, n.2, p.189-195, 2003.

POUND, L.M.; WALLWORK, M.A.B.; POTTS, B.M. E SEDGLEY, M. Self-incompatibility in *Eucalyptus globulus* spp. *globulus* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.50, n.3, p.365-372, 2002.

PROENÇA, C.E.B.; GIBBS, P.E. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. **New Phytologist**, Oxford, v.126, n.2, p.343-354, 1994.

RAJU, B.M.; UMA SHAANKER, R.; GANESHIAH, K.N. Intra-fruit seed abortion in a wind dispersal tree, *Dalbergia sissoo* Roxb.: proximate mechanisms. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v.9, n.5, p.273-278, 1996.

RASEIRA, M. do C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleyanum***. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1996. 95p.

REZENDE, L.P.; PEREIRA, F.M. Produção de mudas de videira 'Rubi' pelo método de enxertia de mesa em estacas herbáceas dos porta-enxertos IAC 313 'Tropical' e IAC 766 'Campinas'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.662-667, 2001.

ROBERTO, S.R.; PEREIRA, F.M.; NEVES, C.S.V.J.; JUBILEU, B.S.; AZEVEDO, M.C.B. Produção antecipada de mudas de videira 'Rubi' (*Vitis vinifera*) através de enxertia verde. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1059-1064, 2004.

RODRIGO, J.; HERRERO, M. **Cuajados erráticos en albaricoquero. Polinización y calidad de flor**. Zaragoza: Institución Fernando el Católico, 2000. 178p.

RODRIGO, J.; HERRERO, M. Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v.11, p.86-93, 1998.

RODRIGO, J.; RIVAS, E.; HERRERO, M. Starch determination in plant tissues using a computerized image analysis system. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.99, n.1, p.105-110, 1997.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**, version 2.1. Exeter Software: New York, 2000. 83p.

SABATINI, D.D.; BENCH, K.; BARNETT, R.J. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. **Journal of Cell Biology**, New York, v.17, n.1, p.19-58, 1963.

SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J.F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, Oxford, v.10, n.3, p.201-210, 2004.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.15-22, 2002.

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

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.

SCHMIDT-ADAM, G.; MURRAY, B.G. Structure and histochemistry of the stigma and style of *Metrosideros excelsa*. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v.40, n.1, p.95-103, 2002.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C.; RASEIRA, M.C.B.; VIGHI, I.L.; ROCHA, P.S.G.; BRAGA, E.J.B. Viabilidade do uso de marcadores RAPD, na avaliação de diversidade genética em seleções de pitangueira, pertencentes ao banco de germoplasma de fruteiras nativas da Embrapa Clima Temperado. **Simiente**, v.72, n.3-4, p.146, 2002.

SEDGLEY, M. Early development of the Macadamia ovary. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v.29, n.2, p.185-193, 1981.

SEDGLEY, M. SMITH, R.M. Pistil receptivity and pollen tube growth in relation to the breeding system of *Eucalyptus woodwardii* (*Symphomyrtus*: Myrtaceae). **Annals of Botany**, London, v.64, n.1, p.21-31, 1989.

SEDGLEY, M.; HAND, F.C.; SMITH, R.M.; GRIFFIN, A.R. Pollen tube growth and early seed development in *Eucalyptus regnans* F. Muell. (Myrtaceae) in relation to ovule structure and preferential outcrossing. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v.37, n.5, p.397-411, 1989.

SHAPCOTT, A. Vagility and the monsoon rain forest archipelago of northern Australia: patterns of genetic diversity in *Syzygium nervosum* (Myrtaceae). **Biotropica**, Washington, v.31, n.4, p.579-590, 1999.

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

SILVA, André Luis Gomes da. **Biologia reprodutiva de quatro espécies de Eugenia L. (Myrtaceae)**. 2006. 99f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Berlin, v.11, n.1, p.30-40, 1962.

SOUZA, Maria Anália Duarte de. **Biologia reprodutiva de onze espécies de Myrtaceae em floresta de terra firme na Amazônia Central**. 1996. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

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

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; REIS, G.G. Efeito do aib no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v.27, n.1, p.1-7, 2003.

UPADHYAY, A.; JAYADEV, K.; MANIMEKALAI, R.; PARTHASARATHY, V.A. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.99, n.3-4, p.353-362, 2004.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, J.F.M.; JÚNIOR, A.T.A. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.489-493, 2003.

VIEIRA, Eduardo Alano. **Mapeamento genético da ameixeira (*Prunus* sp.) com base em uma população segregando para resistência à escaldadura das folhas (*Xylella fastidiosa*)**. 2002. 89f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VIEIRA, E.A.; NODARI, R.O.; DANTAS, A.C.M.; DUCROQUET, J.P.H.J.; DALBÓ, M.; BORGES, C.V. Genetic mapping of Japanese plum. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.5, n.1, p.29-37, 2005.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.V.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

WANG, X.L.; CHIANG, T.Y.; ROUX, N.; HAO, G.; GE, X.J. Genetic diversity of wild banana (*Musa balbisiana* Colla) in China as revealed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.54, n.5, p.1125-1132, 2007.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

WENDLING, I. et al. Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v.24, n.2, p.187-192, 2000b.

WENDLING, I. et al. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v.24, n.2, p.181-186, 2000a.

WENT, J.L.V.; WILLEMSE, M.T.M. Fertilization. In: JOHRI, B.M. **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlang. 1984. p.273-317.

WIENS, D.; CALVIN, C.L.; WILSON, C.A.; DAVERN, C.I.; FRANK, D.; SEAVEY, S.R. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. **Oecologia**, Berlin, v.71, n.4, p.501-509, 1987.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WILSON, G.W.; O'BRIEN, M.M.; GADEK, P.A.; QUINN, C.J. Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial groups. **American Journal of Botany**, Bronx, v.88, n.11, p.2013-2025, 2001.

YAMAGISHI, M.; SHIGEHITO, M.; NAKATSUKA, A.; ITAMURA, H. Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phonetic relationships between *Dyospyros* species by more effective RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.105, n.2, p.283-290, 2005.

ZHU, J; GALÉ, M.D.; QUARRIE, S.; JACKSON, M.T.; BRYAN, G.J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.96, n.5, p.602-611, 1998.

APÊNDICES

Apêndice A

Tabela 16 – Resumo do quadro da análise da variância da percentagem de brotação e pegamento de enxertos em pitangueira, utilizando dois tipos de enxertia de garfagem no topo, em três épocas durante o inverno na região de Pelotas, RS.

Causas da Variação	GL	Brotação ¹		Pegamento ¹	
		QM	Prob. > F	QM	Prob. > F
Época (1)	2	1,00011	0,0076**	0,734171	0,0094**
Tipo de garfagem (2)	1	0,27155	0,2134 ^{NS}	0,673828	0,0312*
1 x 2	2	0,00704	0,9586	0,023150	0,8365
Resíduo	24	0,16619		0,128699	
Total	29				
Coefficiente de variação (%)			18,13		16,93

¹ para análise estatística, os dados de número de brotação e número de pegamento de enxertos foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$.

* e ** = significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

NS = não significativo.

Apêndice B

Tabela 17 – Resumo do quadro da análise da variância da porcentagem de pegamento de enxertos de sete diferentes seleções, utilizando-se a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, durante o inverno na região de Pelotas, RS.

Causas da Variação	GL	Brotação ¹		Pegamento ¹	
		QM	Prob. > F	QM	Prob. > F
Seleção	6	0,602553	0,0006**	0,552801	0,0036**
Resíduo	21	0,093713		0,118221	
Total	27				
Coeficiente de variação (%)		12,06		13,99	

¹ os dados de número de brotação e número de pegamento de enxertos foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ antes da análise estatística.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro.

Apêndice C

Tabela 18 – Resumo do quadro da análise da variância da porcentagem¹ de pegamento dos enxertos de pitangueira, utilizando-se a enxertia de garfagem no topo em fenda cheia, em três diferentes porta-enxertos e em duas épocas, durante o inverno na região de Pelotas, RS.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio	Prob. > F
Porta-enxerto (1)	2	3,882493	0,0000**
Época (2)	1	0,365408	0,1207 ^{NS}
1 x 2	2	0,483808	0,0515 ^{NS}
Resíduo	18	0,137742	
Total	23		
Coeficiente de variação (%)		23,99	

¹ os dados de número de pegamento de enxertos foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ antes da análise estatística.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro.

NS = não significativo

Apêndice D

Tabela 19 – Resumo do quadro da análise da variância da percentagem¹ de frutificação em sete plantas de pitangueira, submetidas a diferentes tratamentos de polinização (T1 – ramos ensacados com TNT; T2 – ensacados com tela anti-afídeo; T3 – polinização livre).

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio	Prob. > F
Planta (1)	6	0,112146	0,0007**
Tratamento (2)	2	1,060490	0,0000**
1 x 2	12	0,022963	0,4655 ^{NS}
Resíduo	42	0,022960	
Total	62		
Coeficiente de variação (%)		36,87	

¹ os dados de percentagem de frutificação foram transformados para ($\arcsen \sqrt{x/100}$) antes da análise estatística,

** significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro.

NS = não significativo

Apêndice E

Tabela 20 – Teste *t* de comparação de médias. Percentagem de crescimento dos tubos polínicos no estilo das flores de duas plantas de pitangueira (“Pit 5” e “PL 1”), entre um e sete dias após a polinização.

Pit 5 Auto polinizada	Média	Variância	Polinização cruzada						
			1	2	3	4	5	6	
			5,0	20,7	84,0	70,0	100	98,0	
			0,0	689,1	480,0	1266,7	0,0	20,0	
1	--	--	--						
2	35,0	190,0		1,156 ^{NS}					
3	94,3	228,6			0,882 ^{NS}				
4	--	--				--			
5	87,1	1157,1					1,000 ^{NS}		
6	--	--						---	
PL 1 Auto polinizada	Média	Variância	Polinização cruzada						
			1	2	3	4	5	7	
			3,5	21,7	78,3	100	98,6	100	
			4,5	336,7	1408,3	0	14,3	0	
1	3,0	3,00	0,289 ^{NS}						
2	32,9	198,8		1,217 ^{NS}					
3	100	0			1,000 ^{NS}				
4	100	0				0,00			
5	100	0					1,001 ^{NS}		
7	100	0						0,00	

NS = não significativo ($P \leq 0,05$)