



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

ELBYA LEÃO GIBSON

**PROPAGAÇÃO SEXUADA, VEGETATIVA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
MINICEPAS DE *Melanoxylon brauna***

JERÔNIMO MONTEIRO – ES
FEVEREIRO - 2019

ELBYA LEÃO GIBSON

**PROPAGAÇÃO SEXUADA, VEGETATIVA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
MINICEPAS DE *Melanoxylon brauna***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Silvicultura e Ecologia Neotropical.

Orientadora: Elzimar de Oliveira Gonçalves

Coorientador: Fábio Demolinari de Miranda

JERÔNIMO MONTEIRO – ES

FEVEREIRO - 2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

G448p Gibson, Elbya Leão, 1993-
Propagação sexuada, vegetativa e diversidade genética de minicepas de *Melanoxylon brauna* / Elbya Leão Gibson. - 2019. 103 f. : il.

Orientadora: Elzimar de Oliveira Gonçalves.
Coorientador: Fábio Demolinari de Miranda.
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Propagação de plantas. 2. Plantas - Nutrição. 3. Marcadores genéticos. 4. Polimorfismo (Genética). I. Gonçalves, Elzimar de Oliveira. II. de Miranda, Fábio Demolinari. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 630

PROPAGAÇÃO SEXUADA, VEGETATIVA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
MINICEPAS DE *Melanoxylon brauna*

Elbya Leão Gibson

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

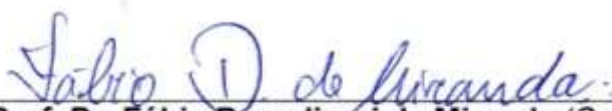
Aprovada em 26 de fevereiro de 2019.



Profª. Drª. Tais Cristina Bastos Soares (Examinadora externa)
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr. Ivar Wendling (Examinador externo)
EMBRAPA FLORESTAS



Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda (Coorientador)
Universidade Federal do Espírito Santo



Profª. Drª. Elzimar de Oliveira Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Espírito Santo

Aos meus pais, Manoel Gibson e Maria Rozana Leão, que sempre me incentivaram a estudar e me motivaram a alcançar meus objetivos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, saúde e por abençoar minha caminhada.

À Universidade Federal do Espírito Santo, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais pela oportunidade.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pela concessão da bolsa de mestrado que foi de suma importância para a realização do curso e pelo apoio financeiro da pesquisa por meio do EDITAL FAPES/SEAG Nº 06/2015 - PPE AGROPECUÁRIA, processo FAPES Nº 76440893/16 e TO 671/16. A Secretaria de Estado de Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca do Estado do Espírito Santo (SEAG) e a Rosal Energia por meio do Convênio de Cooperação técnica Nº de processo: 23068.010686/2012-18.

A minha orientadora, Prof. D.Sc^a Elzimar de Oliveira Gonçalves, pela amizade, conhecimento repassado, pela confiança, paciência, apoio científico e fundamental contribuição na realização deste trabalho, na minha vida acadêmica e profissional.

Ao meu coorientador, Prof. D.Sc Fábio Demolinari de Miranda pela oportunidade e pelos inúmeros ensinamentos proporcionados.

À banca examinadora, representada pelos professores Ivar Wendling e Taís Cristina Soares, pelo tempo dedicado e pelas contribuições neste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, que sempre estiveram dispostos a ajudar.

A minha família, em especial aos meus pais Manoel Gibson e Maria Rozana Leão pelos ensinamentos e apoio em todos esses anos, e que nunca mediram esforços para que eu pudesse hoje estar concluindo mais este ciclo em minha vida, a minha irmã Heleonai Leão pelo grande incentivo e aos meus irmãos Periclles Leão e Talles Leão pelo carinho.

A minha irmã, amiga e companheira de trabalho Aline Ramalho, pelo incentivo, conversas, e batalhas que enfrentamos durante o desenvolvimento de nossas pesquisas. Você foi fundamento em minha vida durante esses dois anos, obrigada por tudo.

Ao Adelson e Lucimara por toda ajuda nas pesquisas e paciência, vocês foram fundamentais no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Otávio, pela amizade, pelos incentivos, pelos conselhos e pelas boas risadas compartilhadas até mesmo nos dias difíceis.

Ao técnico do Viveiro Alessandro, as bolsistas de IC por todos os momentos de descontração e pela ajuda na execução dos experimentos e ao meu amigo Marcos (Bidu) pela bondade e disponibilidade em ajudar.

Aos vigilantes, Josuel, Valle, Juninho e Sebastião, pela ajuda e empréstimo de bicicleta.

Aos amigos da República Amapá, André de Jesus, Maricélia Moreira e Fábio Lacerda, pela amizade e parceria durante o tempo que moramos juntos, proporcionando ótimas histórias.

Aos amigos com quem compartilhei meus medos, momentos de ansiedade, as aventuras e principalmente as alegrias nesses dois anos. Muito obrigado Aline, Caio, Daiana, Eduardo, Emanuel, Lhoraynne, Maricélia, Nayara, Patrícia e Rodrigo.

Aos amigos do NUPEMASE, Davi, Elias, Guilherme, João Paulo, Juliana, Julia, Naiara, Raniéri, Roberto, Raquel, Paulo, Vitor e Valéria, pelas risadas e cafés compartilhados e pelos espaços disputados.

Aos amigos apresentados pela pós-graduação Dâmaris, Elayne, Francielle, Glicia, Genilda e João Vitor, com quem dividi bons momentos nesses dois anos em Jerônimo.

Ao meu grande amigo e orientador, Breno Marques pelo incentivo e encorajamento para que eu seguisse nessa jornada.

Enfim, a todos os que estiveram ao meu lado durante essa trajetória, ajudando direta ou indiretamente, meus mais sinceros agradecimentos

*“A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo”.*

Nelson Mandela.

RESUMO GERAL

GIBSON, Elbya Leão. **Propagação sexuada, vegetativa e diversidade genética de minicepas de *Melanoxylon brauna***. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro – ES. Orientadora: Prof. D.Sc. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Coorientador: Prof. D.Sc. Fábio Demolinari de Miranda

Melanoxylon brauna é uma espécie arbórea nativa da Floresta Atlântica que tem grande potencial para reflorestamentos e arborização urbana. Diante da intensa exploração, encontra-se na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável, despertando o interesse por estudos que visam sua conservação. Desta forma, objetivou-se caracterizar a diversidade genética de minicepas do minijardim clonal e avaliar o potencial propagativo da *M. brauna* por meio das técnicas de estaquia e miniestaquia. A dissertação foi estruturada em três capítulos. No capítulo I, objetivou-se analisar o crescimento, qualidade e a nutrição de mudas de duas procedências de *M. brauna* cultivadas em substrato acrescido de diferentes doses de fertilizante de liberação controlada. As mudas foram produzidas em tubetes de 280 cm³, em delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições, no esquema fatorial 2 x 4, duas procedências (Viçosa, MG e Linhares, ES) e quatro doses, do fertilizante de liberação controlada (FLC) Basacote® Mini 6M: 0; 2,0; 4,0 e 8,0 g dm⁻³. Após 120 dias, foi avaliada a qualidade morfológica das mudas com o intuito de selecionar as duas melhores doses de FLC dentro de cada procedência. Considerando que a *M. brauna* apresenta dificuldades nos processos convencionais de propagação vegetativa, recomenda-se dose de 8,00 kg m⁻³ de fertilizante de liberação controlada para as mudas procedentes de Linhares, ES visando à maximização do crescimento e produção de mudas e formação do minijardim clonal. No capítulo II, objetivou-se avaliar o potencial propagativo de *M. brauna*, por meio das técnicas de estaquia e miniestaquia. Foram selecionadas 250 mudas da procedência de Linhares, ES, adubadas com a dose 8,0 g dm⁻³ do FLC, para a formação do minijardim clonal. Essas mudas (minicepas) foram transplantadas para vasos com capacidade de 7 L. Aos 30 dias pós-transplante, as minicepas foram quebradas na parte apical com intuito de induzir a emissão de novas brotações. Foram realizadas cinco coletas de brotações para contabilizar a produtividade das minicepas. Para o experimento de enraizamento de

miniéstacas foi coletado brotações do minijardim clonal, o mesmo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 4, com quatro repetições, com dois tipos de estacas (caulinar apical e foliar), e cinco concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg kg⁻¹), em tubetes de 55 cm³ preenchidos com substrato comercial. Para o experimento de enraizamento de estacas foram coletadas brotações da copa de matrizes adultas com 6 anos de idade, o mesmo foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 2 x 4, com quatro repetições, com dois tipos de estacas (caulinar apical e foliar), e cinco concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg kg⁻¹), em tubetes de 55 cm³ preenchidos com substrato comercial. Foi avaliado nas miniéstacas enraizadas a porcentagem de enraizamento, sobrevivência, comprimento da maior raiz, área superficial das raízes e diâmetro das raízes. Os dados foram submetidos a análise de variância, utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A propagação vegetativa de *M. brauna* por meio da técnica de miniestaquia é viável a partir de miniéstacas caulinares apicais de matrizes juvenis tratadas com as doses 6000 e 8000 mg kg⁻¹ do AIB. No capítulo III, objetivou-se avaliar a diversidade e estrutura genética em minicepas estabelecidas em um minijardim clonal de *M. brauna*. Para a diversidade genética das minicepas foi coletado material vegetal de 59 indivíduos, em seguida foram testados 24 *primers* do marcador molecular ISSR para a seleção dos mais informativos e posterior amplificação do DNA por PCR. Após a obtenção dos dados, os mesmos foram submetidos as análises. Foram selecionados 11 primers, os quais geraram 183 fragmentos (63,93% de polimorfismo). O conteúdo de informação polimórfica para cada marcador atingiu o valor médio de 0,36, já o número ótimo de locos ISSR foi a partir de 117 fragmentos polimórficos. Alta diversidade genética foi encontrada com os parâmetros de diversidade genética pelos índice de Shannon (I = 0,545) e Nei (H = 0,366) para a amostragem populacional. Na representação gráfica das distâncias genéticas formaram-se 8 grupos, sendo um grupo com a maioria dos genótipos (47 genótipos), cinco grupos com dois genótipos e dois grupos com um genótipo cada. Os resultados revelaram alta diversidade genética nas minicepas de *M. brauna*, determinando o potencial para serem utilizados como matrizes para coleta de propágulos na produção de mudas.

Palavras-chave: Propagação assexuada, conservação da biodiversidade, Floresta Atlântica, Espécies florestais.

ABSTRACT

GIBSON, Elbya Leão. **Sexual and vegetative propagation and genetic diversity of *Melanoxylon brauna* ministumps**. 2019. Dissertation (Master of Forestry Sciences) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro – ES. Adviser: Prof. D.Sc. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Co-adviser: Prof. D.Sc. Fábio Demolinari de Miranda.

Melanoxylon brauna is a native tree species of the Atlantic Forest that has great potential for reforestation and urban afforestation. In face of the intense exploitation, it is on the list of endangered species of Brazilian flora in the category vulnerable, arousing interest in studies aimed at its conservation. This study aimed to characterize the genetic diversity of the ministumps of the mini-clonal hedge and to evaluate the propagation potential of *M. brauna* by means of cutting and minicutting techniques. The dissertation was structured in three chapters. In chapter I, the aim was to analyze the growth, quality and nutrition of *M. brauna* seedlings of two provenances cultivated in substrate supplemented with different doses of controlled release fertilizer. The seedlings were produced in 280 cm³ plastic tubes, in a randomized block design, with four replications, in a 2 x 4 factorial scheme, two provenances (Viçosa, MG and Linhares, ES) and four doses of the controlled release fertilizer (CRF) Basacote[®] Mini 6M: 0; 2.0; 4.0 and 8.0 g dm⁻³. After 120 days, the morphological quality of the seedlings was evaluated in order to select the two best doses of the CRF within each provenance. Considering that *M. brauna* presents difficulties in conventional vegetative propagating processes, the recommended dose of controlled release fertilizer is 8.00 kg m⁻³ for the seedlings from Linhares, ES aiming at the maximization of growth and production of seedlings and formation of the mini-clonal hedge. In chapter II, the aim was to evaluate the propagative potential of *M. brauna*, through cutting and minicutting techniques. It was selected 250 seedlings from Linhares - ES for the mini-clonal hedge formation, fertilized with the 8.0 g dm⁻³ of the CRF. These seedlings (ministumps) were transplanted to vases with a capacity of 7 L. At 30 days post-transplant, the ministumps were broken at the apical part to induce the emission of new shoots. Five collections of shoots were carried out to account for the productivity of ministumps. Shoots of ministumps were collected from the mini-clonal hedge for the minicutting rooting experiment, which was conducted in a completely randomized design (CRD), in a 2 x 4 factorial

scheme, with four replications, with two types of minicuttings (apical and leaf shoots) and five concentrations of indolebutyric acid (IBA) (0, 2000, 4000, 6000 and 8000 mg kg⁻¹) in plastic tubes of 55 cm³ filled with commercial substrate. Shoots were collected from the canopy of adult matrices at six years of age for the cutting rooting experiment, which was conducted in a completely randomized design (CRD), in a 2 x 4 factorial scheme, with four replications, with two types of minicuttings (apical and leaf shoots) and five concentrations of indolebutyric acid (IBA) (0, 2000, 4000, 6000 and 8000 mg kg⁻¹) in plastic tubes of 55 cm³ filled with commercial substrate. The percentage of rooting, survival, length of the longest root, root surface area and root diameter were evaluated in rooted minicuttings. The data were submitted to analysis of variance, using the Tukey test at 5% of probability. The vegetative propagation of *M. brauna* by the minicutting technique is feasible from apical minicuttings of juvenile matrices treated with the doses 6000 and 8000 mg kg⁻¹ of IBA. In chapter III, the aim was to evaluate the genetic diversity and structure in ministumps established in a mini-clonal hedge of *M. brauna*. For the genetic diversity of the ministumps, vegetative material was collected from 59 individuals, then 24 primers of the molecular marker ISSR were tested for selection of the most informative and subsequent DNA amplification by PCR. After obtaining the data, they were submitted to the analyzes. 11 primers were selected, which generated 183 fragments (63.93% of polymorphism). The polymorphic information content for each marker reached the mean value of 0.36, whereas the optimal number of ISSR locus was from 117 polymorphic fragments. High genetic diversity was found with the genetic diversity parameters by the Shannon (I = 0.545) and Nei (H = 0.366) indexes for the population sampling. In the graphical representation of the genetic distances eight groups were formed, one group with the majority of genotypes (47 genotypes), five groups with two genotypes and two groups with one genotype each. The results revealed high genetic diversity in *M. brauna* ministumps, determining the potential to be used as matrices for the collection of propagules in the production of seedlings.

Keywords: Asexual propagation, biodiversity conservation, Atlantic Forest, Forest species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Características dendrológicas da espécie <i>M. brauna</i>	19
Figura 2.1 - Minijardim Clonal de <i>M. brauna</i> , localizado no viveiro florestal universitário da UFES em Jerônimo Monteiro - ES.	56
Figura 2.2 – Poda das minicepas de <i>M brauna</i> para emissão de novas brotações. .	57
Figura 2.3 – Preparo das miniestacas caulinares apicais e foliares de <i>M. brauna</i> ...	58
Figura 2.4 – Processo de desinfestação de miniestacas caulinares apical de <i>M. brauna</i>	58
Figura 2.5 – Preparo das estacas caulinares apicais e foliares de <i>M. brauna</i>	60
Figura 2.6 – Produtividade de miniestacas/m ² /mês (PM/m ² /mês) no minijardim clonal de <i>M. brauna</i> por coleta, com respectivos intervalos entre as coletas das brotações.	63
Figura 2.7 – Enraizamento de miniestaca caulinar apical de <i>M. brauna</i> aos 90 dias em casa de vegetação.	64
Figura 2.8 - Miniestaca foliar de <i>M. brauna</i> enraizada aos 90 dias em casa de vegetação.....	68
Figura 2.9 - A – estacas foliares de matrizes adultas de <i>M. brauna</i> aos 90 dias em casa de vegetação; B – miniestacas caulinares apicais.....	69
Figura 3.1 - Minijardim clonal de onde foi coletado material vegetativo de <i>M. brauna</i>	82
Figura 3.2. Perfil eletroforético demonstrado em gel de agarose a 2% produzidos pelo primer UBC 809 em indivíduos (31 - 59) de <i>M. brauna</i> . M – Marcador de peso molecular (Ladder 100pb).	90
Figura 3.3. Estimativas das correlações entre as similaridades genéticas obtidas pela análise de bootstrap e o número ótimo de fragmentos polimórficos obtidos para a população de <i>M. brauna</i>	91
Figura 3.4. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 59 indivíduos de <i>M. brauna</i> , obtido pelo método UPGMA no programa GENES, formando 8 grupos em toda a amostragem populacional. Ponte de Corte (PC): 58,23%	93
Figura 3.5 - Gráfico da média \pm o desvio padrão de LnP(K) para 20 corridas.....	94
Figura 3.6. Gráfico de barras obtido pela abordagem bayesiana por meio do software STRUCTURE onde está evidenciado a formação de um único grupo genético identificados pela análise do LnP(K). Os números na horizontal correspondem aos 59 indivíduos de <i>M. brauna</i> estudados.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Informações climáticas de Viçosa, MG e Linhares, ES	37
Tabela 1.2 - Caracterização químico-física do fertilizante de liberação controlada Basacote® Mini 6M.	38
Tabela 1.3 - Caracterização químico-física do substrato	38
Tabela 1.4 - Resumo da análise de variância e teste médias das variáveis índice de velocidade de emergência (IVE), emergência (E, %), tempo médio de emergência (TME, dias), e mortalidade aos 60,90 e 120 dias (M, %) após a semeadura, de duas procedências de <i>M. brauna</i> submetidas a diferentes doses de fertilizantes de liberação controlada.	40
Tabela 1.5 - Estimativas geradas pelo efeito das doses de fertilizante de liberação controlada sobre as variáveis de crescimento em altura, diâmetro do coleto, número de folhas e clorofila foliar de mudas de <i>M. brauna</i>	41
Tabela 1.6 - Estimativas geradas pelo efeito das doses de fertilizante de liberação controlada sobre as variáveis de crescimento radicular (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), índice de qualidade de Díckson (IQD) e acúmulo de nutrientes de fósforo, cálcio, magnésio e enxofre na parte aérea de mudas de <i>M. brauna</i> da procedência Linhares aos 120 dias.....	42
Tabela 2.1 - Resumo da análise de variância para as variáveis: porcentagem de sobrevivência (S %) e porcentagem de enraizamento (E%) de miniestacas caulinares apicais de <i>M. brauna</i> aos 90 dias em casa de vegetação.....	64
Tabela 2.2 - Resumo da análise de variância para as variáveis: comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), brotos (BRT), vigor (VG), número total de raízes (NTR), diâmetro médio das raízes (DM), área superficial (AS), volume de raiz (V), massa seca parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), massa seca de total (MST) de miniestacas caulinares apicais de <i>M. brauna</i> aos 90 dias em casa de vegetação.....	65
Tabela 2.3 - Médias da porcentagem de sobrevivência, porcentagem de enraizamento, diâmetro médio das raízes (DM) e volume de raiz (V) de miniestacas caulinares apicais de <i>M. brauna</i> , sob diferentes doses de AIB, aos 90 dias.	66
Tabela 2.4 - Resumo da análise de variância para as variáveis: porcentagem de sobrevivência (S %) e porcentagem de enraizamento (E%) de miniestacas caulinares apicais de <i>M. brauna</i> aos 90 dias em casa de vegetação.....	66
Tabela 2.5 - Resumo da análise de variância para as variáveis: comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), vigor (VG), número total de raízes (NTR), diâmetro médio das raízes (DM), área superficial (AS), volume de raiz (V) e massa seca de raízes (MSR) de miniestacas foliares de <i>M. brauna</i> aos 90 dias em casa de vegetação.....	67

Tabela 2.6 - Médias da porcentagem de sobrevivência (S%) e de enraizamento (E%), número de raízes (NR), número total de raízes (NTR), volume de raiz (V), área superficial (AS) e massa seca de raízes (MSR) de miniestacas foliares de *M. brauna*, sob diferentes concentrações de AIB.....67

Tabela 3.1 Informações climáticas de Linhares, ES.....83

Tabela 3.2. Primers ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia e suas respectivas sequências, testados em amostras *M. brauna*, cultivadas em minijardim clonal.....86

Tabela 3.3. Primers ISSR selecionados para *M. brauna* com o peso molecular estabelecido com base em marcador de 100pb (PM) máximo e mínimo dos fragmentos obtidos, número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por primer, e conteúdo da informação de polimorfismo (PIC).89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Aspectos gerais da <i>Melanoxylon brauna</i>	19
2.2. Propagação vegetativa de espécies florestais.....	20
2.3. Fatores que interferem na propagação vegetativa por miniestaquia	22
2.3.1. Nutrição mineral da planta matriz.....	23
2.3.2. Uso de reguladores de crescimento vegetal	24
2.4. Marcadores moleculares ISSR	25
3. REFERÊNCIAS	27
Capítulo 1 FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE PROCEDÊNCIAS DE <i>Melanoxylon brauna</i>	32
RESUMO.....	33
ABSTRACT	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
3. RESULTADOS	40
4. DISCUSSÃO.....	43
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS	47
Capítulo 2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE <i>Melanoxylon brauna</i> POR ESTAQUIA E MINIESTAQUIA	50
RESUMO.....	51
ABSTRACT	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1. Descrição do local	55
2.2. Estabelecimento do minijardim clonal	55
2.3. Enraizamento de miniestacas de matrizes juvenis de <i>M. brauna</i>	57
2.4. Enraizamento de estacas de matrizes adultas de <i>M. brauna</i>	59
2.5. Avaliações	61
2.5.1. Produtividade das minicepas.....	61
2.5.2. Sobrevivência, enraizamento e vigor das miniestacas.....	61

2.5.3. Determinação do comprimento, área superficial e diâmetro das raízes	62
3. RESULTADOS	63
4. DISCUSSÃO.....	70
5. CONCLUSÃO	73
6. REFÊRENCIAS	74
Capítulo 3 DIVERSIDADE GENÉTICA DE MINICEPAS ESTABELECIDAS EM UM MINIJARDIM CLONAL DE <i>Melanoxylon brauna</i>	77
RESUMO.....	78
ABSTRACT	79
1. INTRODUÇÃO.....	80
2. MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1. Seleção e obtenção do material para a caracterização genética	82
2.2. Extração de DNA.....	83
2.3. Amplificações ISSR	84
2.4. Análises dos dados moleculares	86
3. RESULTADOS	89
4. DISCUSSÃO.....	96
5. CONCLUSÃO	99
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
7. REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui a segunda maior área florestal em nível mundial, que abriga importantes recursos hídricos, expressiva biodiversidade e valiosas matérias primas. Por outro lado, a perda de cobertura florestal do Brasil está entre as maiores do mundo, causada principalmente pela intervenção humana, crescimento populacional, práticas inadequadas na agropecuária e construções de complexos industriais (FAO, 2015; KEENAN et al., 2015).

Machado (2012) apontou que o desmatamento no território brasileiro iniciou-se primeiramente no litoral com a destruição da mata atlântica para a extração do pau Brasil, acelerando o processo de fragmentação desse bioma o que resultou na diminuição da abundância de espécies vegetais, com conseqüente redução da variabilidade genética dessas espécies (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2017).

Dentre as espécies que sofrem com processo de fragmentação da Floresta Atlântica, destaca-se a *Melanoxylon brauna* Schott, espécie arbórea pertencente à família Fabaceae, que devido à sua exploração, encontra-se na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (BRASIL, 2014).

Conhecida popularmente como braúna, a espécie tem grande potencial para reflorestamento e arborização urbana (LORENZI, 2008). No entanto, sua propagação, pelo método sexuado, é limitada devido a perda de viabilidade das sementes durante o armazenamento, a dificuldade de seleção de matrizes para coleta de sementes e devido à presença de pragas e doenças, que predam as sementes, reduzindo o poder germinativo (FREIRE et al., 2013).

Como alternativa para a superação das dificuldades na propagação sexuada da *M. brauna*, busca-se fazer uso de técnicas da propagação vegetativa, como a técnica de miniestaquia. Esta é uma técnica que consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo processo de estaquia, ou de mudas produzidas por sementes (ALFENAS et al., 2009).

Na propagação vegetativa por miniestaquia, a indução de raízes adventícias pode ser influenciada por alguns fatores, como: condições fisiológicas e nutrição mineral da planta matriz; balanço hormonal e condições ambientais (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). A nutrição mineral da planta matriz é de grande importância, pois promove o melhor vigor vegetativo da planta, maior produtividade

de brotações, além de exercer efeito significativo nos índices de enraizamento e na velocidade de formação das raízes (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Os fertilizantes de liberação controlada vêm ganhando espaço nos viveiros de produção de mudas florestais, por apresentarem vantagens na redução dos custos de produção devido ao maior aproveitamento da área pela diminuição do ciclo da cultura, da mão de obra e por redução das operações (NAVROSKI et al., 2016).

Outro fator que exerce influência na propagação por miniestacas é o balanço hormonal, visto que para a formação de raízes adventícias, é necessária a presença de certos níveis de hormônios na planta, sendo as auxinas de maior interesse, pois promovem a indução e crescimento de raízes adventícias. Entre os compostos com atividades auxínicas têm-se o ácido indolbutírico (AIB) um dos reguladores exógenos mais eficientes no enraizamento (PAIVA; GOMES, 2011).

Na reprodução assexuada existe a preocupação quanto à diversidade genética, que é necessária quando o objetivo é a recomposição e recuperação de áreas degradadas (DIAS et al., 2012). Entretanto, quando o minijardim clonal é formado por matrizes propagadas via seminal, o material fornecido é mais diversificado para a produção de mudas possibilitando sua conservação (OLIVEIRA et al., 2016).

Em estudos evolutivos e de diversidade genética em plantas, o uso de marcadores moleculares tem sido ferramentas importantes, sendo os marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) amplamente utilizado, por não necessitarem de informações prévias do genoma, revelando padrões altamente polimórficos e pelo fato de os procedimentos laboratoriais poderem ser aplicados para qualquer espécie vegetal (ZIETKIEWICZ, RAFALSKY E LABUDA, 1994; ROSSI et al., 2014).

Com base no exposto, este estudo partiu das seguintes hipóteses: (I) as doses crescentes de fertilizante de liberação controlada potencializam a produtividade de minicepas de *M. brauna* ; (II) o uso da técnica de miniestaquia, como forma de propagação assexuada da *M. brauna*, é um método viável tecnicamente para a produção de mudas desta espécie; (III) o uso de AIB influencia no enraizamento e qualidade do sistema radicular das mudas de *M. brauna*; (IV) a utilização dos marcadores moleculares ISSR é eficiente para determinar a diversidade genética dos indivíduos e o minijardim clonal da *M. brauna* apresenta alta variabilidade genética entre as minicepas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da *Melanoxylon brauna*

A *Melanoxylon brauna* Schott (Fabaceae), popularmente conhecida como braúna, braúna-preta, baraúna ou garaúna é uma espécie florestal nativa da mata atlântica, que tem potencial para reflorestamento e arborização urbana. Ocorre naturalmente na floresta pluvial da encosta atlântica das regiões Nordeste e Sudeste, especialmente nos Estados da Bahia, São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (LORENZI, 2008; OLIVEIRA FILHO, 2006).

Segundo Lorenzi (2008), a *M. brauna* tem como características principais: altura de 15 a 25 m, com tronco de 40 a 80 cm de diâmetro, folhas alternas espiraladas, compostas imparipinadas, com 15 a 19 folíolos glabros (Figura 1). O fruto é um legume deiscente e seco, contendo no seu interior estruturas membranosas envolvendo as sementes permitindo que elas sejam dispersas pelo vento. A floração ocorre de fevereiro a abril, com o amadurecimento dos frutos de setembro a outubro.

Figura 1.1 – Características dendrológicas da espécie *M. brauna*.



Fonte: Autora. . A - Árvore em campo; B - Muda com 120 dias; C - caule; D - Fruto e E – Sementes.

A madeira da *M. brauna* possui densidade média de $1,05 \text{ g cm}^{-3}$, considerada pesada e de grande durabilidade mesmo quando exposta a ambientes adversos (CAMPOS FILHO; SARTORELLI, 2015). Devido a estes aspectos, sua madeira tem sido alvo de exploração, restando poucos fragmentos florestais contendo a espécie, como os fragmentos mencionados em estudos realizados por Crepaldi; Peixoto (2010) e Versieux et al. (2011). Essa espécie é classificada como semidecídua e heliófita, pertencente ao grupo ecológico das espécies secundaria tardia (SILVA et al., 2003).

A faixa ótima de temperatura para germinação das sementes de *M. brauna* é de $25\text{-}30^\circ\text{C}$, pois promove a estabilidade térmica necessária para o funcionamento das membranas celulares e aumenta a possibilidade de sobrevivência dos indivíduos na presença de fatores adversos, como a restrição hídrica (FLORES et al., 2013; ATAIDE; BORGES; LEITE FILHO, 2016). No entanto, Santos et al. (2016) relatou que a *M. brauna* apresenta baixa taxa de germinação.

Segundo Barbosa et al. (2008) a propagação de *M. brauna* via seminal é comprometida pelos danos causados às sementes por duas espécies de bruquídeos, *Sennius spodiogaster* e *Sennius cupreatus*, que inviabilizam em torno de 50% a germinação.

Outro fator que compromete a propagação sexuada da *M. brauna* é o fato das sementes perderem a viabilidade quando armazenadas. Corte et al. (2010) observaram que quando as sementes de *M. brauna* foram submetidas ao envelhecimento natural no decorrer de 12 meses de armazenamento, resultou na progressiva redução na capacidade germinativa das sementes e no índice de velocidade de germinação (IVG), além de aumento no tempo médio de germinação (TMG).

Neste contexto, devido a *M. brauna* encontrar-se na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável, e apresentar dificuldades de propagação via seminal devido a problemas de germinação, haja vista ser esta sua principal forma de propagação, busca-se por alternativas e o aprimoramento de técnicas de propagação para esta espécie.

2.2. Propagação vegetativa de espécies florestais

A propagação de plantas ocorre de duas formas, sexuada e assexuada ou vegetativa. A primeira dar-se por meio do uso de sementes, enquanto que a

segunda faz uso de propágulos vegetativos. A propagação vegetativa consiste em multiplicar partes de plantas, permitindo a reprodução fiel do genótipo da planta mãe, dada a totipotência da célula vegetal, ou seja, a capacidade de qualquer célula do organismo vegetal de regenerar uma planta completa (PAIVA; GOMES, 2011; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

A utilização da propagação vegetativa de espécies florestais em programas de melhoramento genético e de conservação tem como finalidades acelerar o crescimento, aumentar a produtividade, atender a demanda comercial e reduzir os níveis de ameaça das espécies (ALFENAS et al., 2009; VALERI et al., 2012). Entre as técnicas de propagação vegetativa, com potencial de uso pode-se citar a estaquia, miniestaquia, microestaquia, enxertia e propagação *in vitro* (FERRARI; GROSSI; WENDLING, 2004).

A propagação por miniestaquia é uma técnica que surgiu a partir do aprimoramento da estaquia convencional, que consiste, basicamente, na utilização de brotações de plantas propagadas pelo processo de estaquia, ou mudas produzidas por sementes e conduzidas em minijardim clonal, fazendo o aproveitamento do potencial juvenil dos propágulos para indução do enraizamento (ALFENAS et al., 2009; FERRIANI et al., 2011)

Essa técnica visa colocar um segmento caulinar, foliar ou radicular em meio adequado para enraizamento e desenvolvimento da parte aérea, objetivando a formação de uma muda completa (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

O processo de propagação vegetativa por miniestaquia segue uma sequencia esquemática, em que inicialmente realiza-se a poda do ápice da muda, com o intuito de promover a quebra da dominância apical e induzir novas brotações. As novas brotações (miniéstaca) são coletadas e então utilizadas para o enraizamento, assim sucessivamente novas coletas são realizadas em intervalos variáveis, em razão do crescimento e vigor das brotações (WENDLING et al., 2002)

Dessa forma, a parte basal da muda podada constitui uma minicepa (com 6 a 10 cm de altura), que fornecerá as brotações (miniéstacas) para formação das futuras mudas clonais, sendo que o conjunto de minicepas forma o minijardim clonal, que é definido como a área de multiplicação vegetativa e encontra-se instalado dentro do viveiro florestal em condições protegidas (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

No minijardim clonal, as minicepas podem ser conduzidas em tubetes, tubos de PVC, vasos diversos e sistema de hidroponia (WENDLING; DUTRA, 2008). Segundo Cunha et al. (2008) a porcentagem de sobrevivência pode estar relacionada com tratos culturais empregados como nutrição equilibrada, irrigação em níveis ótimos e bom manejo de condução das minicepas.

A propagação vegetativa por estaquia faz uso de segmentos caulinares, raízes, brotos apicais e folhas para induzir o enraizamento e originar novas plantas. Essa técnica é bastante utilizada na produção de mudas, pois permite manter as características do material genético, diminuir o tempo de obtenção das mesmas e possibilita a uniformidade de enraizamento, além de reduzir o período juvenil (HARTMANN et al., 2011).

Alguns estudos com espécies florestais têm sido realizados, visando verificar a possibilidade de propagação vegetativa por estaquia e miniestaquia. Menezes, Sampaio, Blind (2018) observaram que a propagação vegetativa por estaquia e miniestaquia de *Aniba rosaeodora* Ducke é possível com miniestacas originadas de material juvenil. Dias et al. (2015) observaram que a miniestaca apical com 10 cm de comprimento e com folha inteira mostrou-se mais adequada à propagação vegetativa de angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*) por miniestaquia, a partir de material seminal.

Além desses citados, outros estudos com espécies florestais foram realizados como o de Silva et al. (2012) com cedro-australiano (*Toona cilata*), Souza (2016) com paricá (*Schizolobium amazonicum*) e guapuruvu (*Schizolobium parahyba*), Ferreira et al. (2010) com leiteiro (*Sapium glandulatum*), e Menezes; Sampaio; Blind (2018) com pau-rosa (*Aniba Rosaeodora* Ducke).

2.3. Fatores que interferem na propagação vegetativa por miniestaquia

A formação de raízes adventícias, no processo de propagação vegetativa, sofre influência de diversos fatores que irão proporcionar o sucesso ou o fracasso da produção de mudas. Entre os principais fatores que atuam no enraizamento de estacas estão aqueles relacionados com o genótipo, as condições fisiológicas e de nutrição mineral da planta fornecedora das estacas, os substratos de enraizamento, o armazenamento das estacas, a sanidade e aplicação de reguladores vegetais, época do ano, assim como os fatores relacionados com a manipulação das

condições ambientais principalmente luminosidade, temperatura e umidade (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013; WENDLING et al., 2009).

2.3.1. Nutrição mineral da planta matriz

Um aspecto importante a ser considerado na formação de raízes adventícias é a nutrição mineral. Os nutrientes têm importante função para diversos processos bioquímicos, moleculares, enzimáticos e fisiológicos que ocorrem na planta (CUNHA et al., 2009).

A nutrição mineral atua não só no vigor vegetativo da planta matriz e na produção de brotações, mas também no status nutricional do propágulo coletado, influenciando significativamente nos índices de enraizamento e na velocidade de formação das raízes (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Pires et al. (2015) relatou que o uso de solução nutritiva apresentou influência significativa na produção de miniestacas de *Araucaria angustifolia*, aumentando a produtividade em aproximadamente 40 %.

Embora o enraizamento e a nutrição mineral estejam intimamente relacionados, poucos estudos têm sido divulgados visando à caracterização dos efeitos de nutriente específicos envolvidos no processo (CUNHA et al. (2009). Segundo Alfenas et al. (2009), teores adequados de nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, boro e magnésio são importantes no processo de diferenciação e formação do sistema radicular.

Rocha et al. (2015) estudando o efeito de doses de nitrogênio na produtividade, capacidade e velocidade de enraizamento de miniestacas de um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, constataram efeito significativo positivo das doses de nitrogênio aplicada no minijardim clonal para as variáveis estudadas. Souza et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes, observaram correlação positiva entre o teor de nitrogênio e a produtividade de miniestacas nos minijardins multiclonais em canaletão e em tubetes para o cedro-australiano (*Toona cilata*).

Brondani et al. (2012) verificaram em estudo com *Eucalyptus benthamii* que as soluções nutritivas S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) e S6 (2,0 mg L⁻¹ de Zn e B) favoreceram a produção de miniestacas, a qualidade do broto e a sobrevivência de minicepas, sendo recomendadas para a miniestaquia da espécie em vasos.

O emprego de fertilizantes de liberação controlada, na fertilização de substratos em viveiros florestais, representa uma das viáveis e racionais alternativas, pois permite a redução do número de adubações de cobertura e diminui as perdas de nutrientes por volatilização e lixiviação (NAVROSKI et al., 2016).

Informações técnicas e biológicas sobre a produtividade de minijardim clonal, sob o uso de fertilizantes de liberação controlada, ainda são incipientes e escassas na propagação de espécies florestais, sendo necessária a realização de estudos que avaliam o comportamento da espécie diante do uso de doses de fertilizantes de liberação controlada, uma vez que um correto fornecimento nutricional permite uma maior produtividade, qualidade e sucesso das mudas em campo.

2.3.2. Uso de reguladores de crescimento vegetal

Para formação de raízes adventícias em miniestacas, é necessária a presença de certos níveis de substâncias de crescimento natural na planta. Varias substâncias quando aplicadas exógenamente, promovem ou inibem a iniciação de raízes adventícias, dependendo da espécie, tipo de estaca e estado de maturação (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Existem várias substâncias com propriedades reguladoras de crescimento vegetal, sendo as auxinas as de maior interesse no enraizamento de estacas, pois promovem a indução e crescimento de raízes adventícias. (PAIVA; GOMES, 2011).

Dentro do grupo das auxinas encontram-se diversas substâncias com atividades reguladoras de crescimento, como o ácido indolilacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sendo o AIB um dos reguladores exógenos mais eficientes no enraizamento, em razão de sua menor mobilidade e maior estabilidade química no interior da estaca (HARTMANN et al., 2011; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Souza (2016) avaliando a técnica de miniestaquia na propagação vegetativa de paricá (*Schizolobium amazonicum*), verificou que o enraizamento de miniestacas intermediárias é favorecido com o uso de AIB em concentrações de 40.000 mg L⁻¹, e para as miniestacas apicais a dose de 20.000 mg L⁻¹ foi a mais viável.

Engel et al. (2017) em estudo com três diferentes clones de *Acacia mearnsi*, denominados A, B e C, observaram que a concentração de AIB influencia no enraizamento, bem como na qualidade do sistema radicial, principalmente nas doses de 4000 e 6000 mg L⁻¹. As maiores porcentagens de enraizamento foram

encontradas nas concentrações de 6000 mg L⁻¹ para os clones A e C (70,83% e 79,17%, respectivamente), e para o clone B a concentração de 4000 mg L⁻¹, apresentou maior taxa de enraizamento (93,75%).

Contudo, a concentração do regulador utilizada na formação de raízes adventícias, varia de acordo com a espécie, clone, estado de maturação, tipo de estaca, forma e tempo de aplicação, sendo necessária a realização de estudos que avaliam a ação dos reguladores no enraizamento de espécies que não dispõem de informações a respeito da concentração ideal.

2.4. Marcadores moleculares ISSR

Estudos avaliando a estrutura genética de populações têm sido realizadas visando sugerir mecanismos e estratégias de preservação da diversidade genética e de conservação ambiental de várias espécies vegetais de interesse econômico e ambiental. Para estes estudos são aplicados marcadores moleculares, pois fornecem informações que identificam tendências evolutivas e relações filogenéticas entre as espécies (BEI et al., 2014; ALAM et al., 2015).

O uso de marcadores moleculares de DNA são ferramentas importantes em estudos de melhoramento genético de plantas, visando o mapeamento de genes, a análise de diversidade genética e aos estudos evolutivos (BORÉM; CAIXETA, 2009). Desta forma, os marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TOPPA; JADOSKI, 2013).

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), são amplamente utilizados em estudos de diversidade e variabilidade genética, mostrando-se vantajosos em comparação com outros métodos, por não necessitarem de informações prévias do genoma, revelando padrões altamente polimórficos e pelo fato de os procedimentos laboratoriais poderem ser aplicados para qualquer espécie vegetal (ZIETKIEWICZ, RAFALSKY E LABUDA, 1994; NG; TAN, 2015.).

A utilização desses marcadores exerce vantagem em relação a outros marcadores moleculares, a exemplo dos AFLP devido o elevado custo, os RAPD devido à baixa reprodutibilidade e os SSRs pelo fato de serem específicos à espécie destinada (IDREES; IRSHAD, 2014).

Esses marcadores também têm sido utilizados com sucesso em análises de diversidade genética em espécies arbóreas tais como: *Schizolobium parahyba* var.

amazonicum (SILVA JÚNIOR et al., 2017), *Plathymenia reticulata* Benth. (SOUZA et al., 2017), *Bertholletia excelsa* (RAMALHO, 2016), *Hancornia speciosa* Gomes (COSTA et al., 2015) e *Lecythis pisonis* Cambess (BORGES, 2016). Em tais pesquisas, os marcadores demonstraram potencial para revelar e quantificar a diversidade genética das espécies.

3. REFERÊNCIAS

ALAM, M.A., JURAIMI, A.S., RAFII, M.Y., HAMID, A.A., AROLU, I.W., LATIF, M.A. Genetic diversity analysis among collected purslane (Portulacaoleracea L.) accessions using ISSR markers. **C. R. Biol.** v. 338, p.1 - 11, 2015.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 500p.

ATAIDE, G. M.; BORGES, E. E. L.; LEITE FILHO, A. T. Alterações fisiológicas e biométricas em sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante a germinação em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 40, n. 1, p. 61-70, 2016..

BARBOSA, W. F. et al., 2008. *Paracrias pluteus* (Hymenoptera: Eulophidae): Uma nova alternativa para o controle de bruquídeos em sementes florestais. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 22., 2008, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: Universidade Federal de Viçosa, Universidade Federal de Uberlândia, Embrapa Milho e Sorgo, 2008. Disponível em: <[http://seb.org.br/asp/eventos/CBE/XXIIICBE/verartigo.asp?cod=P464&titulo=%3CI%3EPARACRIAS%20PLUTEUS%3C/I%3E%20\(HYMENOPTERA:%20EULOPHIDAE\):%20UMA%20NOVA%20ALTERNATIVA%20PARA%20O%20CONTROLE%20DE%20BRUQU%CDDEOS%20EM%20SEMENTES%20FLORESTAIS](http://seb.org.br/asp/eventos/CBE/XXIIICBE/verartigo.asp?cod=P464&titulo=%3CI%3EPARACRIAS%20PLUTEUS%3C/I%3E%20(HYMENOPTERA:%20EULOPHIDAE):%20UMA%20NOVA%20ALTERNATIVA%20PARA%20O%20CONTROLE%20DE%20BRUQU%CDDEOS%20EM%20SEMENTES%20FLORESTAIS)>. Acesso em: 14 dez 2018.

BEI, Y., CHEN, W., SUN, B., LI, J., LAI, J., MENG, S. Population structure of the endangered Hume's pheasant (*Syrnaticushumiae*) inferred from a partial sequence of the mitochondrial DNA control region. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 57, p.69-77, 2014.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2a Ed. Viçosa-MG: Editora UFV, 2009. 532 p.

BORGES R.C. et al. Investigating genetic diversity in sapucaia using inter simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n.º 443, de 14 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2014. Seção 01, p. 121. Disponível em: <<http://sintse.tse.jus.br/documentos/2014/Dez/18/portaria-no-443-de-17-de-dezembro-de-2014>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

BRONDANI, G. E. et al. Miniestquia de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. (I) Sobrevivência de minicepas e produção de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 11-21, 2012.

CAMPOS FILHO, E. M.; SARTORELLI, P. A. R. **Guia de árvores com valor econômico**. São Paulo: Agroicone, 2015. 141 p.

CORTE, V. B. et al. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 83-91, 2010.

COSTA, D. F. et al. Genetic diversity and ISSR initiators selection in a natural population of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

CREPALDI, M.O.S.; PEIXOTO, A.L. Use and knowledge of plants by “*Quilombolas*” as subsidies for conservation efforts in an area of Atlantic Forest in Espírito Santo State, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 37-60, 2010.

CUNHA, A. C. M. C. M. et al. Relação do estado nutricional de minicepas com o enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 591-599, 2009.

CUNHA, A. C. M. C. M.; WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Miniestaquia em sistema de hidroponia e em tubetes de corticeira-do-mato. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 18, n. 1, p. 85-92, 2008. Disponível em:

DIAS et al. Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 389-399, 2015.

DIAS, P. C. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

ENGEL, M. L. et al. Enraizamento de miniestacas de diferentes clones de *Acacia mearnsii* De Wildeman com aplicação de AIB. **Revista Espacios**, Caracas, v. 38, n. 23, p. 8-19, 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global Forest Resources Assessment 2015. **FAO Forestry Paper No. 1**. Rome: 2015.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2004. (Embrapa Florestas. Documentos, 94). 22 p.

FERREIRA, B. G. A. et al. Miniestaquia de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax com o uso de ácido indol butírico e ácido naftaleno acético. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 1, p. 19-31, 2010.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília: Embrapa – CERNAGEN, p. 220, 1998.

FERRIANI, A. P. et al. Produção de brotações e enraizamento de miniestacas de *Piptocarpha angustifolia*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 31, n. 67, p. 257-264, 2011.

FLORES, A. V. et al. Umedecimento do substrato e temperatura na germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott.. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, Recife, v. 8, n. 3, p. 454-457, 2013.

FREIRE, J. M. et al. Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em área fragmentada de Mata Atlântica em Itaboraí, RJ. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 75, p. 243-252, 2013.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011. 900 p.

IDREES, M.; IRSHAD, M. Molecular Markers in Plants for Analysis of Genetic Diversity: A Review. **European Academic Research**, v. 2, n. 1, p. 1513-1540, 2014.

KEENAN, R.J. et al. Dynamics of global forest area: Results from the FAO Global Forest Resources Assessment 2015. **Forest Ecology and Management**, v.352, n.7, p.9-20, 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v.1, 368p.

MACHADO, C.A. 2012. **Desmatamentos e queimadas na região Norte do Estado do Tocantins**. Revista caminhos de Geografia, Vol. 13, n. 43.

MENEZES, A.; SAMPAIO, P. T.; BLIND, A.D. Propagação de pau-rosa (*Aniba Rosaeodora* Ducke) por estacas e miniestacas. **Nucleus**. 2018. V. 15, n. 1, p. 515-522.

NAVROSKI, M.C. et al. Efeito do volume do tubete e doses de fertilizantes no crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Agrarian**, v. 9, p. 26-33, 2016.

NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *ASM Science Journal*, v. 9, p. 30-39, 2015.

OLIVEIRA FILHO, A. T. **Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais: mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 423p.

OLIVEIRA, T. P. F. et al. Aplicação de AIB e tipo de miniestacas na produção de mudas de *Handroanthus heptaphyllus* Mattos. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 313-320, 2016.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. 1 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 52p.

PIRES, P. P. et al. Sazonalidade e soluções nutritivas na miniestaquia de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 2, p. 283-293, 2015.

RAMALHO, A. B. et al. Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**, v. 46, n. 2, p. 207-214, 2016.

ROCHA, J. H. et al. Produtividade do minijardim e qualidade de miniestacas de um clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (1-224) em função de

doses de nitrogênio. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 2, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5902/1980509818411>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

ROSSI, F. S. et al. Genetic diversity in natural populations of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) using ISSR markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n. 104, p. 631-639, 2014.

SANTOS, J. J. A. et al. Desenvolvimento vegetativo de mudas de *Melanoxylon brauna* utilizando quebras de dormência e substratos diferentes. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DA DIVERSIDADE DO SEMIÁRIDO, 1., 2016, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Editora Realize, 2016. p. 1-9. Disponível em: <https://editorarealize.com.br/revistas/conidis/trabalhos/TRABALHO_EV064_MD1_S A2_ID522_08102016211448.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2018.

SILVA JUNIOR, A. L. et al. Genetic diversity of *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex. Ducke) Barneby, in a forest area in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 3, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://nupemase.com/_files/200001540-e7b19e8b3e/artigoschizolobium-parahyba%20GMR%20Ms%20%20Adelson.pdf>. Acesso em: 06 mar 2018.

SILVA, A. F. et al. Composição florística e grupos ecológicos das espécies de um trecho de floresta semidecídua submontana da Fazenda São Geraldo, Viçosa-MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 311-319, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622003000300006>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

SILVA, M. P. S. et al. Enraizamento de miniestacas e produtividade de minicepas de cedro australiano manejadas em canaletões e tubetes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 4, p. 703-713, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5902/198050987552>>. Acesso em: 29 jan 2019.

SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS – INPE. **Atlas dos remanescentes da Mata Atlântica - período 2015-2016**. São Paulo: SOS Mata Atlântica; Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2017. 69p. Disponível em: <http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/atlas_2015-2016_relatorio_tecnico_2017.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2018.

SOUZA, C. C. **Propagação vegetativa de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex. Ducke) e guapuruvu (*Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake) por miniestaquia**. 2016. 78 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

SOUZA, J. S. et al. Produtividade de minicepas de cedro-australiano em função do teor inicial de nutrientes. **Floresta**, v. 45, n. 3, p. 617-624, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/ufv.v45i3.36529>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SOUZA, L.C.; et al. Genetic diversity of *Plathymenia reticulata* Benth. in fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, 2017.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O Uso dos Marcadores Moleculares no melhoramento Genético de Plantas. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 12, n. 1, p. 1- 5, 2013.

VALERI, S. V., et al. Enraizamento de estacas de *Caesalpinia echinata* Lam. em hidroponia. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p 241-250, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5902/198050985731>>. Acesso em: 06 dez. 2018.

VERSIEUX, L. M. et al. Characterization of the tree component in a semideciduous forest in the Espinhaço Range: a subsidy to conservation. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 2, p. 85-94, 2011.

WENDLING, I. et al. Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomía Costarricense**, San José, v. 33, n. 2, p. 309-319, 2009.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Solução nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 5 p.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. **Curso intensivo de viveiros e produção de mudas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002, 48 p. (Documentos, 79).

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal** - Princípios e Técnicas. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. 280 p.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain-reaction amplification. **Genomics**, New York, v. 20, p. 176-183, 1994.

Capítulo 1 FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE PROCEDÊNCIAS DE *Melanoxylon brauna*

Artigo aceito para publicação na revista Floresta e Ambiente, em: 04/12/2018.

RESUMO

Melanoxylon brauna é uma espécie florestal nativa da Floresta Atlântica, que apresenta alto valor ecológico e econômico. Objetivou-se avaliar o crescimento e a nutrição de mudas de duas procedências de *M. brauna* cultivadas em substrato acrescido de diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (FLC). O delineamento experimental foi em blocos casualizado, disposto em esquema fatorial 4 x 2, referentes a quatro doses de FLC Basacote® Mini 6M (0; 2; 4 e 8 kg m⁻³), cuja formulação é 13-6-16, com tempo de liberação de 5 a 6 meses e duas procedências de sementes (Viçosa, MG e Linhares, ES), com quatro repetições e 126 sementes por parcela. Aos 120 dias após semeadura, as mudas foram coletadas para mensuração das variáveis relacionadas à emergência de plântulas, crescimento e nutrição de mudas. O maior crescimento e teor nutricional das mudas foi observado para a procedência Linhares na dose 8,00 kg m⁻³ de FLC. Já a procedência Viçosa, MG apresentou baixa emergência e alta mortalidade de indivíduos independente da dose de FLC.

Palavras-chave: Braúna, propagação de plantas, silvicultura, leguminosa florestal, nutrição florestal.

ABSTRACT

Melanoxylon brauna is a tree species native to the Atlantic Forest of high ecological and economic value. The objective of this study was to evaluate the growth and nutritional status of seedlings of two cultivars of *M. brauna* grown in substrate with different rates of controlled-release fertilizer (CRF). The experiment was arranged in a randomized block 4x2 factorial design, with four CRF rates (0, 2, 4, and 8 kg m⁻³) and two seed origins (Viçosa-MG and Linhares-ES), with four replications and 126 seedlings per plot. At 60, 90, and 120 days after emergence, the seedlings were collected to measure variables related to emergence, growth, and nutrition. The greatest growth and best nutritional status were found for seedlings originated from seeds collected in Linhares at the rate 8 kg m⁻³ of CRF. On the other hand, seedlings originated from seeds collected in Viçosa showed low emergence and high plant mortality.

Keywords: Brauna, plant propagation, forestry, forest legume, forest nutrition.

1. INTRODUÇÃO

A *Melanoxylon brauna* Schott (Fabaceae-Caesalpinioideae), conhecida como braúna ou braúna-preta, é uma arbórea nativa de floresta pluvial da encosta atlântica das regiões Nordeste e Sudeste (LORENZI, 2009; CARVALHO, 2010). Descrita por Brito; Carvalho (2014) como secundária tardia, a espécie apresenta grande importância ecológica e econômica. Indivíduos adultos normalmente possuem entre 15 a 20 m de altura e 40 a 80 cm de diâmetro (LORENZI, 2002). Sua madeira tem reconhecida qualidade e durabilidade com característica acastanhada, quase negra nos espécimes mais velhos, sendo considerada uma madeira de lei de grande valor econômico (LORENZI, 2009).

Devido à intensa exploração e a falta de programas de reflorestamento, a espécie está incluída na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (BRASIL, 2014), restando poucos fragmentos florestais com indivíduos desta espécie, em geral pequenos e isolados. Carvalho et al. (2007) relataram que a *M. brauna* raramente tem sido registrada em levantamentos florísticos, fato que coloca em risco a conservação da espécie e alerta para a necessidade de conservação de fragmentos florestais com certa diversidade florística.

Estudos avaliando o desempenho de espécies florestais a partir da coleta de sementes de diferentes procedências são de grande valor por possibilitar conhecer e explorar o potencial das procedências em diferentes condições ambientais e para as diferentes finalidades (OHASHI; YARED; FARIA NETO, 2010).

Apesar do grande valor ambiental e potencial madeireiro da *M. brauna*, falta informações sobre sua silvicultura. Na literatura são escassas as informações a respeito de formas e estratégias de propagação da espécie, assim estudos que tratam da tecnologia de sementes, produção de mudas via seminal ou clonal e crescimento inicial em campo de *M. brauna* deve ser investigado com urgência.

Uma tecnologia na área de fertilizantes, que vem ganhando espaço nos viveiros de produção de mudas florestais são os fertilizantes de liberação controlada (FLC). Esse tipo de fertilizante apresenta evidentes vantagens na redução dos custos de produção devido ao maior aproveitamento da área pela diminuição do ciclo da cultura, da mão de obra, por redução das operações e otimização do espaço, da água e energia (NAVROSKI et al., 2016).

Esses fertilizantes são revestidos por polímero deliberadamente feitos para liberar o nutriente ativo de maneira controlada, prolongando a duração da liberação de nutrientes e em sincronia com as necessidades metabólicas da planta. Os FLCs foram projetados para ter a liberação ideal de nutrientes, onde a taxa de liberação correspondesse à taxa máxima de absorção pelas plantas, que varia dinamicamente durante os estágios de desenvolvimento da planta durante a estação de crescimento (IRFAN et al., 2018).

Diante disso, objetivou-se com este estudo analisar o crescimento, qualidade e a nutrição de mudas de duas procedências de *M. brauna* cultivadas em substrato acrescidos de diferentes doses de FLC. Para isso, testou-se a hipótese de que as doses de FLC exercem influência no crescimento e nutrição de mudas de duas procedências de *M. brauna*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado e conduzido no viveiro florestal universitário localizado na área experimental do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira pertencente à Universidade Federal do Espírito Santo (DCFM-CCA-UFES), em Jerônimo Monteiro, ES, durante os meses julho de 2017 a novembro de 2017. A área experimental possui latitude de 20° 47' S e longitude de 41° 23' W e altitude de 120 m. O clima da região é classificado por Köppen como sendo do tipo Cwa (inverno seco e verão chuvoso), com temperatura média anual de 24,1 °C, a precipitação média anual é de 1104 mm (MAIA et al., 2007).

As sementes de *M. brauna* foram coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, e Linhares, Espírito Santo, Brasil, adquiridas via comercialização realizada por empresa registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Tabela 1.1 - Informações climáticas de Viçosa, MG e Linhares, ES

Município	Classificação Köppen, (1948)	Precipitação média (mm ano ⁻¹)	Dias com precipitação ao ano	Temperatura média compensada	Altitude média	Umidade relativa (%)	Horas de brilho solar
Viçosa	Cwa	1.289	92	20,1	690	80,3	2.098,2
Linhares	Aw	1.267	116	24,0	33	83	2.182,3

Fonte: Adaptado INMET (2018).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 2 x 4, com quatro repetições, sendo estudadas duas procedências de *M. brauna* (Viçosa, MG e Linhares, ES) em resposta a quatro doses, 0 (controle); 2,0; 4,0 e 8,0 kg m⁻³, do FLC Basacote® Mini 6M, cuja formulação é 13-6-16, com tempo de liberação de 5 a 6 meses (Tabela 1.2). Cada unidade experimental foi constituída por 126 mudas, totalizando 4032 parcelas iniciais.

Tabela 1.2 - Caracterização químico-física do fertilizante de liberação controlada Basacote® Mini 6M.

N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Mg	S	Fe	Cu	Mn	Mo	Diâmetro grânulos	Peso de 1.000 grãos
-----%-----									Mm	g
13,00	6,00	16,00	1,40	10,00	0,26	0,05	0,06	0,015	1,5 – 2,5	9,58

Fonte: Fabricante.

As diferentes doses de FLC foram adicionadas no substrato comercial (casca de Pinus, vermiculita, resíduo orgânico agroindustrial classe A, serragem de madeira, esterco – camas de equinos, NPK, umidade de 55%), antes do preenchimento dos tubos para que todos recebessem quantidades iguais de grânulos, de acordo com cada tratamento. Foram coletadas amostras do substrato antes da instalação do experimento para caracterização química (Tabela 1.3), segundo metodologia de Silva (2009).

Tabela 1.3 - Caracterização químico-física do substrato

pH	N	P	K	Ca	Mg	S	CE	Densidade
(H ₂ O)	----- g kg ⁻¹ -----					mS cm ⁻¹	g cm ⁻³	
6,2	11,5	9,0	5,2	15,0	7,2	4,5	0,4	0,35

A semeadura foi realizada a 0,3 cm de profundidade em tubetes de polipropileno de 280 cm³, com dimensões externas de 64,5 mm, internas de 52 mm e altura de 190 mm, em casa de sombra com redução de 50% na intensidade luminosa. Cada tubete recebeu uma semente, que foram submetidas à quebra de dormência por meio da escarificação mecânica com lixa d'água de nº 120, até o desgaste visível do tegumento do lado oposto ao hilo e em seguida foram previamente desinfestadas em álcool 70% sob agitação durante um minuto e solução de hipoclorito de sódio (2%) por cinco minutos, seguido de tríplex lavagem em água destilada.

Foi analisada a emergência (E, em porcentagem, %), calculada pela equação proposta nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), índice de velocidade de emergência (IVE), sendo consideradas emergidas as plântulas que apresentavam cotilédones acima do substrato e o tempo médio de emergência (TME, dias).

Aos 60, 90 e 120 dias após a emergência foram determinadas as seguintes variáveis: mortalidade (M, em porcentagem, %), a altura da parte aérea (H, cm), avaliada a partir do colo da muda até a inserção da última folha, com auxílio de uma régua graduada; diâmetro do colo (DC, mm), medido ao nível da borda do tubo utilizando um paquímetro digital; o incremento em H e DC aos 90 e 120 dias pela diferença entre os valores observados na época de avaliação menos a do mês anterior; o número de folhas (NF), determinada por meio da contagem do número de folhas visíveis; teor de clorofila das folhas (CFT, $\mu\text{g cm}^{-2}$), leitura dos teores de clorofila, amostrando-se folhas intermediárias das mudas por meio de medidor portátil de clorofila SPAD-502.

Para determinação da massa seca da parte aérea (MSPA; g) e massa seca de raízes (MSR; g), quatro mudas por repetição foram coletadas aleatoriamente aos 120 dias, onde o material vegetal foi dividido em parte aérea e raiz. O sistema radicular foi separado do solo por meio de lavagem com água corrente, e avaliado o comprimento da raiz principal (CR, cm). Em seguida, o material foi acondicionado em sacos de papel e colocado para secar em estufa de circulação forçada de ar a temperatura de 65 °C até peso constante, sendo então pesado em balança analítica (com precisão de 0,0001 g), as MSPA e MSR. A MST (g planta^{-1}) foi a soma da MSPA e MSR. Após obtenção dessas variáveis, foi realizada a determinação do Índice de Qualidade de Díckson (IQD).

Após a secagem em estufa, a MSPA das plantas foi moída em moinho Willey® de aço inoxidável, e tamisado em peneira de 20 mesh para determinação dos teores nutricionais de fósforo (P, g kg^{-1}), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S1), segundo metodologia descrita em Silva (2009). O acúmulo de cada nutriente na parte aérea foi obtido pela multiplicação o teor e a MSPA.

Os dados foram submetidos à análise de variância e ao verificar diferenças significativas, pelo teste F a 5%, as duas procedências foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% e 1% de probabilidade e as doses à análise de regressão a fim de verificar a dose ótima do FLC para cada variável, por meio da primeira derivada dos estimadores β_0 e β_1 . Para a escolha das equações foi considerada a significância dos parâmetros, teste t, o significado e realismo biológico dos modelos (linear e quadrático) e o coeficiente de determinação (R^2). As análises foram realizadas utilizando o programa SISVAR 5.4 (Ferreira, 2014).

3. RESULTADOS

A partir dos resultados na análise de variância (Tabela 1.4), observou-se que houve efeito ($p \leq 0,05$) isolado da procedência das sementes de *M. brauna* para o IVE, E, M 90 e M 120 dias. A procedência MG apresentou baixo IVE, com uma porcentagem final de emergência muito baixo, que associado à alta mortalidade dos poucos indivíduos sobreviventes aos 90 e 120, inviabilizaram a continuidade do experimento com esta procedência. Verificou-se que as doses de FLC não afetam ($p > 0,05$) as variáveis relacionadas à emergência de plântulas de *M. brauna*.

Tabela 1.4 - Resumo da análise de variância e teste médias das variáveis índice de velocidade de emergência (IVE), emergência (E, %), tempo médio de emergência (TME, dias), e mortalidade aos 60,90 e 120 dias (M, %) após a semeadura, de duas procedências de *M. brauna* submetidas a diferentes doses de fertilizantes de liberação controlada.

FV	GL	Quadrados médios					
		IVE	E (%)	TME (dias)	M 60 (%)	M 90 (%)	M 120 (%)
Procedência	1	1,209**	82,34**	0,6980 ns	2,771ns	24,577*	107,534*
Doses	3	0,0057 ns	0,230 ns	0,2609 ns	4,085ns	5,901 ns	3,109 ns
D x P	3	0,012 ns	0,701ns	0,340 ns	2,345ns	3,806 ns	5,504ns
Bloco	3	0,014ns	0,727ns	0,3185ns	17,44ns	2,324 ns	4,101ns
Resíduo	21	0,0059	0,321	0,300	4,649	8,319	2,584
CV %		6,08	15,35	13,98	60,93	52,15	22,05
Média ES		1,160 a	27,48 a	15,59 a	14,84 a	21,90 a	29,48 a
Média MG		0,162 b	3,67 b	13,81 a	18,95 a	51,97 b	87,29 b

* e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente; ns não significativo a 5% de probabilidade.

As doses de FLC não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) a H das mudas de *M. brauna* da procedência ES aos 60 dias, contudo promoveram um crescimento linear crescente ($p \leq 0,05$) aos 90 e 120 dias após o início da emergência. O incremento máximo em H entre o período de 60 a 90 dias, foi de 7,94 cm planta⁻¹ mês⁻¹ (Tabela 1.5). Para o incremento em H do período entre 90 e 120 dias, o melhor ajuste foi quadrático, onde o valor máximo de 5,34 cm planta⁻¹ mês⁻¹ foi obtido quando se utiliza a dose 7,12 kg m⁻³ de FLC.

Tabela 1.5 - Estimativas geradas pelo efeito das doses de fertilizante de liberação controlada sobre as variáveis de crescimento em altura, diâmetro do coleto, número de folhas e clorofila foliar de mudas de *M. brauna*.

Variável	Equação	R ²	D M R	Valor máximo estimado
H 60	ns ($\hat{Y} = \bar{Y} = 3,21$)	-	-	-
H 90	$\hat{Y} = 5,132 + 0,7924^{**}x$	0,88	8,00	11,47 cm planta ⁻¹
H120	$\hat{Y} = 6,5702 + 1,3377^{**}x$	0,86	8,00	17,27 cm planta ⁻¹
Inc H90	$\hat{Y} = 2,1597 + 0,7229^{**}x$	0,86	8,00	7,94 cm planta ⁻¹ mês ⁻¹
Inc H120	$\hat{Y} = 0,7057 + 1,303^{**}x - 0,09145^{**}x^2$	0,97	7,12	5,34 cm planta ⁻¹ mês ⁻¹
DC 60	ns ($\hat{Y} = \bar{Y} = 1,61$)	-	-	-
DC 90	$\hat{Y} = 1,4835 + 0,1297^{**}x$	0,83	8,00	2,52 mm planta ⁻¹
DC 120	$\hat{Y} = 1,82745 + 0,17524^{**}x$	0,81	8,00	3,22 mm planta ⁻¹
Inc DC90	$\hat{Y} = 0,181 + 0,2904^{**}x - 0,0239^{**}x^2$	0,98	6,07	1,06 mm planta ⁻¹ mês ⁻¹
Inc DC120	$\hat{Y} = 0,258716 + 0,1335^{**}x - 0,0239^{**}x^2$	0,98	6,28	0,67 mm planta ⁻¹ mês ⁻¹
NF 60	ns ($\hat{Y} = \bar{Y} = 9,86$)	-	-	-
NF 90	$\hat{Y} = 4,968 + 2,055^{**}x - 0,149311^{**}x^2$	0,99	6,88	12,03 Un. planta ⁻¹
NF 120	$\hat{Y} = 5,139 + 2,518^{**}x - 0,1887^{**}x^2$	0,99	6,67	13,54 Un. planta ⁻¹
CF 60	$\hat{Y} = 25,97805 + 1,21621^{**}x$	0,84	8,00	35,70 ug cm ² planta ⁻¹
CF 90	$\hat{Y} = 28,159 + 3,137^{**}x - 0,2786^{**}x^2$	0,97	5,62	36,99 ug cm ² planta ⁻¹
CF 120	$\hat{Y} = 21,079 + 4,767^{**}x - 0,37243^{**}x^2$	0,99	6,39	36,33 ug cm ² planta ⁻¹

* e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente; ns não significativo a 5% de probabilidade. DMR (dose de máxima resposta).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) das doses de FLC no crescimento em DC das mudas de *M. brauna* aos 60 dias. No entanto, aos 90 e 120 dias, independentemente das doses FLC o crescimento em DC das mudas de *M. brauna* foram superiores às médias das mudas do tratamento testemunha que não continha FLC incorporado ao substrato. A tendência de crescimento foi linear crescente aos 90 e 120 dias (Tabela 1.5). O incremento em DC foi maior no intervalo de 60 aos 90 dias e a dose 6,07 kg m⁻³ de FLC promoveu o maior crescimento neste período. Desse modo, é possível deduzir que plantas desta espécie são bastante responsivas a adubação inicial em fase de mudas, principalmente após 60 dias.

Para o NF o modelo quadrático foi o que melhor explicou o efeito das doses nas idades 90 e 120 dias, em que a produção máxima, de 12,03 e 13,54 folhas planta⁻¹, foram obtidas na 6,88 e 6,67 kg m⁻³ de FLC. Houve duas tendências de

crescimento para a CF, aos 60 dias o crescimento foi linear crescente. Nas idades 90 e 120 dias, o crescimento foi quadrático e as doses de máxima resposta foram 5,62 e 6,39 kg m⁻³ de FLC (Tabela 1.5).

Para o CR, a produção de MSPA, MSR, MST e o IQD o comportamento predominante foi de ordem linear crescente, obtendo maiores médias na dose 8,00 kg m⁻³ de FLC (Tabela 1.6).

Tabela 1.6 - Estimativas geradas pelo efeito das doses de fertilizante de liberação controlada sobre as variáveis de crescimento radicular (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), índice de qualidade de Díckson (IQD) e acúmulo de nutrientes de fósforo, cálcio, magnésio e enxofre na parte aérea de mudas de *M. brauna* da procedência Linhares aos 120 dias.

Variável	Equação	R ²	D M R	Valor máximo estimado
CR	$\hat{Y} = 18,2150 + 2,0725^{**}x$	0,86	8,00	34,79 cm planta ⁻¹
MSPA	$\hat{Y} = 0,11788 + 0,412254^{**}x$	0,99	8,00	3,41 g planta ⁻¹
MSR	$\hat{Y} = -0,00991 + 0,08763^{**}x$	0,98	8,00	0,69 g planta ⁻¹
MST	$\hat{Y} = 0,10797 + 0,49989^{**}x$	0,99	8,00	4,10 g planta ⁻¹
IQD	$\hat{Y} = 0,00617 + 0,04851^{**}x$	0,99	8,00	0,39
APPA	$\hat{Y} = 0,83857 + 1,9081^{**}x$	0,78	8,00	16,10 mg planta ⁻¹
ACaPA	$\hat{Y} = 0,5143 + 2,2617^{**}x$	0,79	8,00	18,60 mg planta ⁻¹
AMgPA	$\hat{Y} = 0,0396 + 0,5605^{**}x$	0,81	8,00	4,52 mg planta ⁻¹
ASPA	$\hat{Y} = 0,079096 + 0,5833^{**}x$	0,96	8,00	4,74 mg planta ⁻¹

* e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente; ns não significativo a 5% de probabilidade. DMR (dose de máxima resposta).

Na avaliação nutricional de fósforo, cálcio, magnésio e enxofre, verifica-se a mesma tendência, a dose 8,00 kg m⁻³ de FLC promoveu o maior acúmulo de nutrientes na MSPA das mudas de *Melanoxylon brauna* (Tabela 1.6).

4. DISCUSSÃO

Ao se analisar os resultados das variáveis de emergência de *M. brauna* procedente de Viçosa, MG, é possível inferir que, possivelmente, houve problemas de viabilidade e/ou armazenamento das sementes, visto que a percentagem de emergência foi muito baixa. Há relatos encontrados na literatura, que postulam que a espécie apresenta grande amplitude de germinação com relação à temperatura, sendo verificada a germinação na faixa de 12,1 a 43,0 ° C, e com temperatura ótima de 27,0 ° C, verificado com teste de condutividade elétrica (FLORES et al., 2014). Contudo, Borges et al. (2015), ao analisarem as respostas da germinação e vigor de sementes de *M. brauna* (procedentes de Leopoldina, MG) em resposta ao armazenamento por oito meses sob umidades relativas de 55, 75 e 93% e temperatura de 20 ° C, constataram que a velocidade e porcentagem de germinação decrescem com o aumento do teor de água do ambiente, e em ambientes de armazenamento de 75 e 93% as sementes tendem a morrer, em decorrência das condições estressantes de umidade.

Outra possível explicação estaria ligada à distribuição geográfica natural de *M. brauna*. Segundo Dyer et al. (2007), espécies de plantas em regiões tropicais estão expostas há uma pluralidade de condições edafoclimáticas.

Essa heterogeneidade ambiental, combinada com a seleção natural, resulta em populações geneticamente distintas, assim, nos projetos de restauração florestal, a introdução de populações não locais pode trazer, como consequências, problemas para a sobrevivência desses indivíduos, os quais possivelmente não são tão bem adaptados às condições ambientais presentes nesse novo local, em comparação com os genótipos locais, tal adaptação é referida como fitness (HUMPHREY; SCHUPP, 2002; RODRIGUES, 2009).

Em relação às variáveis relacionadas ao crescimento e nutrição das mudas, valida-se a hipótese que o FLC favorece o crescimento e o aumento de teor nutricional de mudas de *M. brauna*. O modelo de regressão linear ajustado para a maioria das variáveis não permitiu prever a dose ótima ou de máxima eficiência técnica para as mudas desta espécie, o que sinaliza, que podem haver ganhos ainda maiores no crescimento de mudas desta espécie com aplicação de doses mais elevadas de FLC. Observa-se que, nas condições deste experimento a dose

8,00 kg m⁻³ foi a que promoveu maior crescimento e, qualidade nutricional de mudas de *M. brauna*.

Destaque para H, DC, MSR e na MST, variáveis utilizadas para avaliar o crescimento e a qualidade das mudas arbóreas e podem estar correlacionados com a sobrevivência e o crescimento das plântulas no campo. Sob a concepção de recuperação de áreas degradadas, mudas de qualidade, bem nutridas com máximo vigor em viveiro podem se estabelecer mais rapidamente em campo sob condição adversas, passando mais rapidamente pelos estádios iniciais e críticos de desenvolvimento de forma mais rápida. Segundo Soares & Carneiro (2010) um sistema radicular mais vigoroso pode, no campo, recuperar e aumentar atividade microbiológica do solo, além de contribuir para o aumento da biomassa, favorecendo uma melhor agregação e estruturação do solo.

É importante destacar que, o incremento em H e DC aos 120 dias das mudas foram menores em relação ao incremento aos 90 dias. Esse comportamento pode ser atribuído à dinâmica de crescimento da espécie em doses maiores de FLC, no qual as mudas desses tratamentos ficaram com espaço no tubete limitado mais precocemente, o que pode ter influenciado o crescimento radicular e todo o metabolismo da planta. Essa hipótese é reforçada, pela observação frequente de raízes lançadas para fora na extremidade do tubete, sofrendo processo de oxidação. Fato que pode ainda ter se desdobrado no aumento da mortalidade em termos percentuais dentro do período de 60 a 120 dias. Além disso, o DC máximo das mudas de *M. brauna* aos 120 dias, 3,22 mm, ficou abaixo do intervalo proposto por Gonçalves et al. (2000) que preconiza que o DC com bom padrão de qualidade de mudas de espécies florestais para comercialização está entre 5 e 10 mm. Sendo assim, sugere-se, estudos visando analisar doses maiores de FLC aos testados no presente estudo, e recipientes com volumes maiores para a produção de mudas dessa espécie.

Informações na literatura sobre a produção de mudas de *M. brauna*, assim como do final da fase expedição em viveiro, em que as mudas são encaminhadas para campo são incipientes. Esses estudos seriam de fundamental importância para fins de comparação sobre valores ideais para o crescimento. De modo geral, a literatura mostra que as espécies florestais são bastante responsivas a adição de FLC ao substrato. Navroski et al. (2016), constataram que mudas de cedro (*Cedrela fissilis*) apresentam bom crescimento quando são incorporados ao substrato 5 kg m⁻³

de FLC. Para a produção de mudas de *Moringa oleifera*, Rosa et al. (2018) verificaram melhoria no crescimento de mudas quando utilizaram o fertilizante de liberação controlada na dose de $5,37 \text{ kg m}^{-3}$ de substrato.

Essa tendência foi observada também por Rossa et al. (2015), onde a aplicação de FLC leva a ganhos significativos de crescimento de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*) e aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*), sendo as melhores doses $5,54$ a $6,68 \text{ kg m}^{-3}$ para a espécie angico-vermelho, e $8,38$ a $14,42 \text{ kg m}^{-3}$ para aroeira-vermelha. Dutra et al. (2016) concluíram que mudas de canafístula (*Peltophorum dubium*) responderam ao uso do FLC, apresentando melhor crescimento e padrão de qualidade sob doses entre $5,4$ a $8,2 \text{ g dm}^{-3}$.

É crescente o interesse em informações silviculturais de espécies arbóreas da flora brasileira, principalmente após o país assumir compromissos internacionais pelo combate às mudanças do clima no Acordo de Paris, 2015, por meio do reflorestamento de 12 milhões de hectares até 2030 (BRASIL, 2018).

A pesar dos notórios avanços na silvicultura de nativas, são necessários estudos visando estabelecer condições nutricionais ótimas para cada espécie cultivada.

5. CONCLUSÃO

Tendo como referência a massa seca total, recomenda-se dose 8,00 kg m⁻³ de fertilizante de liberação controlada para a procedência Linhares, ES visando à maximização do crescimento de produção de mudas de *M. brauna*.

6. REFERÊNCIAS

BORGES, E. E. L. et al. Alterações fisiológicas e atividade enzimática em sementes armazenadas de *Melanoxylon brauna* Schott. **Cerne**, v.21, p.75-81, 2015. Disponível em: < <https://www.redalyc.org/html/744/74433488010/>>. Acesso em: 10 set. 2019

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. Acordo de Paris. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/convencao-das-nacoes-unidas/acordo-de-paris>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n.º 443, de 14 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2014. Seção 01, p. 121. Disponível em: <<http://sintse.tse.jus.br/documentos/2014/Dez/18/portaria-no-443-de-17-de-dezembro-de-2014>>. Acesso em: 20 out. 2018.

BRITO, P. S.; CARVALHO, F. A. Estrutura e diversidade arbórea da Floresta Estacional Semidecidual secundária no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 65, n. 4, p. 817-830, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S217578602014000400002&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: 28 set. 2018.

CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). **Revista Árvore**, v.31, p.717-730, 2007. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48831417>>. Acesso em: 28 set. 2018.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**, v. 4. Brasília, DF: Embrapa Florestas, 2010, 644p.

DUTRA, T. R.; MASSAD, M. D.; SARMENTO, M. F. Q. Fertilizante de liberação lenta no crescimento e qualidade de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). *Floresta* 2016; 46(4): 491-498. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/44570/30149>>. Acesso em: 28 set. 2018.

DYER, L. A. et al. Host specificity of Lepidoptera in tropical and temperate forests. **Nature**, v.448, 696-700, 2007. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/6152894_Host_specificity_of_Lepidoptera_in_tropical_and_temperate_forests>. Acesso em: 28 out. 2018

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FLORES, A. V. et al. Germination of *Melanoxylon brauna* Schott seed in different temperatures. **Revista Árvore**, v.38, n.6, p.1147-1154, 2014. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622014000600019>. Acesso em: 28 set. 2018

GONÇALVES, J. L. M. et al. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J. L.M.; BENEDETTI, V. (Ed.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p.309-350.

HUMPHREY, L. D.; SCHUPP, E. W. Seedling survival from locally and commercial obtained seeds on two semiarid sites. **Restoration ecology**, v.10, n.1, p.88-95, 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1526-100X.2002.10109.x>> . Acesso em: 26 set. 2018

IRFAN, S. A. et al. A review of mathematical modeling and simulation of controlled-release fertilizers. *Journal of Controlled Release* 2018; 271(10): 45-54. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365917310842>>. Acesso em: 24 set. 2018

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2002 368p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. v.1. 368p

MAIA, A. R.; LOPES, J. C.; TEIXEIRA, C. O. Efeito do envelhecimento acelerado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de trigo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 678-684, 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/240771945_Efeito_do_envelhecimento_a_celerado_na_avaliacao_da_qualidade_fisiologica_de_sementes_de_trigo>. Acesso em: 29 set. 2018.

NAVROSKI, M. C. et al. Procedência e adubação no crescimento inicial de mudas de cedro. **Pesquisa florestal brasileira**, v. 36, n. 85, p. 17-24, 2016. Disponível em: <<https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/966>>. Acesso em: 29 set. 2018.

OHASHI, S. T.; YARED, J. A. G.; FARIAS NETO, J. T. Variabilidade entre procedências de paricá *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby plantadas no município de Colares – Pará. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 1, mar. 2010.

RODRIGUES, R. R. (Ed.). **Pacto pela restauração da mata atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. LERF; Piracicaba: ESALQ, 2009. Disponível em: <<http://www.lerf.esalq.usp.br/divulgacao/produzidos/livros/pacto2009.pdf>>. Acesso em 23 set. 2018.

ROSA, T. L. M. et al. Controlled release fertilizer in the growth of *Moringa oleifera* LAM. seedlings. **Floresta**, v. 48, n. 3, p. 303-310, 2018. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/50063/35484>>. Acesso em: 21 set. 2018.

ROSSA, U. B. et al. Fertilizante de liberação lenta no desenvolvimento de mudas de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg.(angico-vermelho) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha). **Ciência Florestal** 2015; 25(4): 841-852. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/20582>>. Acesso em: 24 set. 2018.

SILVA, F. C. D. A. S. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

SOARES, C.R.F.S. E.; CARNEIRO, M. A. C. (2010) – **Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas degradadas**. In: Siqueira, J.O.; Souza, F.A.; Cardoso, E.J.B.N. & Tsai, S.M. (Ed.s) – *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras-MG, UFLA, p 441-474.

**Capítulo 2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Melanoxylon brauna* POR
ESTAQUIA E MINIESTAQUIA**

RESUMO

A *Melanoxylon brauna* é uma espécie florestal nativa da Floresta Atlântica, que apresenta alto valor ecológico e econômico. Contudo, encontra-se ameaçada de extinção. Informações detalhadas sobre processos de propagação e produção de mudas desta espécie são escassas e necessárias. O método de propagação usual de *M. brauna* é via seminal, entretanto a oferta sazonal das sementes e sua curta viabilidade ao longo do tempo representam um problema para a produção contínua de mudas. Neste contexto, objetivou-se avaliar a viabilidade da propagação vegetativa da espécie por estaquia e miniestaquia e a necessidade da aplicação de AIB para o enraizamento. O material vegetativo para o enraizamento de estacas foi coletado de plantas adultas, localizados em uma propriedade particular no município de Jerônimo Monteiro - ES. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), testando-se cinco concentrações de AIB (0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg kg⁻¹) e dois tipos de estacas (caulinar apical e foliar) com quatro repetições, cada unidade experimental foi formada por dez estacas. Para o enraizamento de miniestacas de matrizes juvenis, foi coletado material vegetativo de minicepas do minijardim clonal localizado no viveiro florestal universitário. O experimento foi realizado em DIC, testando-se cinco concentrações de AIB (0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg kg⁻¹) e dois tipos de estacas (caulinar apical e foliar) com quatro repetições, cada unidade experimental foi formada por cinco miniestacas. Após 90 dias em casa de vegetação, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência e enraizamento, o número de raízes, o comprimento da maior raiz, a massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e massa seca total das estacas e miniestacas. As raízes das miniestacas enraizadas foram digitalizadas em um scanner, em seguida as imagens foram submetidas ao programa SAFIRA para quantificação da área superficial, volume e diâmetro das raízes. As estacas não foram avaliadas por não apresentarem enraizamento. Com base nos resultados podemos inferir que é possível o enraizamento de miniestacas caulinares apicais e foliares de *M. brauna* sob condições controladas de umidade e temperatura, entretanto, as estacas foliares não apresentaram emissão de brotação e crescimento da parte aérea no período de 90 dias.

Palavras-chave: *Melanoxylon brauna*, enraizamento, dominância apical.

ABSTRACT

Melanoxylon brauna is a native forest species of the Atlantic Forest, which presents high ecological and economic value. However, it is threatened with extinction. Detailed information on seedling propagation and production processes of this species is scarce and necessary. The usual propagation method of *M. brauna* is seminal, however the seasonal supply of seeds and their short viability over time represent a problem for the continuous production of seedlings. In this context, the aim was to evaluate the viability of the vegetative propagation of the species by cutting and minicutting and the necessity of the application of IBA for rooting. The vegetative material for the rooting of cuttings was collected from adult plants, located in a private property in the city of Jerônimo Monteiro - ES. The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD), with five concentrations of IBA (0, 2000, 4000, 6000 and 8000 mg kg⁻¹) and two types of cuttings (apical and leaf shoots) with four replications, each experimental unit was formed by ten cuttings. For the rooting of minicuttings of juvenile matrices, vegetative material of ministumps was collected from the mini-clonal hedge located in the University Forest Nursery. The experiment was performed in a CRD, with five concentrations of IBA (0, 2000, 4000, 6000 and 8000 mg kg⁻¹) and two types of cuttings (apical and leaf shoots) with four replicates, where each experimental unit consisted in five minicuttings. After 90 days in greenhouse, the percentage of survival and rooting, number of roots, length of the longest root, aerial part dry mass, root dry mass and total dry mass of the cuttings and minicuttings were evaluated. The roots of rooted minicuttings were digitized in a scanner, then the images were submitted to the SAFIRA program to quantify the surface area, volume and root diameter. The cuttings were not evaluated for not rooting. Based on the results, it can be inferred that it is possible to root the minicuttings of the apical and foliar shoots of *M. brauna* under controlled conditions of humidity and temperature, however, the leaf cuttings did not present shoot emission and shoot growth in the 90 day period.

Keywords: *Melanoxylon brauna*, rooting, apical dominance.

1. INTRODUÇÃO

A *Melanoxylon brauna* Schott, é amplamente distribuída na floresta pluvial da encosta atlântica das regiões Nordeste e Sudeste (LORENZI, 2009; CARVALHO, 2010). É uma espécie com grande potencial para reflorestamentos e arborização urbana (LORENZI, 2008). Sua madeira tem reconhecida qualidade e durabilidade, sendo considerada uma madeira de lei de grande valor econômico, devido sua intensa exploração, encontra-se na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (BRASIL, 2014; LORENZI, 2009).

A produção de mudas de *M. brauna* é dificultada devido à semente ser um insumo limitado, restringindo a obtenção de sementes durante todo o ano, à perda de viabilidade quando armazenadas por períodos de tempo longos e devido à presença de pragas e doenças, que predam as sementes, reduzindo o poder germinativo. No entanto, avaliar a aptidão dessa espécie a propagação vegetativa, pode ser uma alternativa viável para superação das dificuldades encontradas na propagação via seminal (XAVIER et al., 2003; FREIRE et al., 2013).

As técnicas de propagação vegetativa, como estaquia e miniestaquia, quando bem-sucedidas promovem a superação das dificuldades encontradas na propagação via seminal de espécies nativas, podendo ser utilizadas para diversos fins comerciais e auxiliar na conservação de recursos genéticos florestais (DIAS et al., 2012). A miniestaquia é uma técnica que surgiu a partir do aprimoramento da estaquia convencional, que consiste, basicamente, na utilização de brotações de plantas propagadas pelo processo de estaquia, ou mudas produzidas por sementes (ALFENAS et al., 2009).

Na propagação vegetativa, a formação de raízes adventícias pode ser influenciada por alguns fatores, como: condições fisiológicas e nutrição mineral da planta matriz; balanço hormonal; condições ambientais (luminosidade, temperatura e umidade), entre outros (HARTMANN et al., 2011; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

A aptidão de enraizamento de espécies florestais é influenciada pelo grau de maturação. Na fase juvenil as plantas apresentam maior potencial de enraizamento que plantas adultas, pois apresentam substâncias endógenas que promovem a indução e desenvolvimento de raízes adventícias, como também menor lignificação dos tecidos (HARTMANN et al., 2011).

A presença e o equilíbrio endógeno dos reguladores vegetais exerce forte influência na emissão de raízes adventícias, sendo as auxinas de maior interesse, por promoverem a indução e crescimento de raízes adventícias. Entre os compostos com atividades auxínicas têm-se o ácido indolbutírico (AIB) um dos reguladores exógenos mais eficientes no enraizamento (PAIVA; GOMES, 2011).

Além da aplicação de reguladores de crescimento, o tipo de estaca utilizada pode influenciar no enraizamento de plantas, devido à existência de uma variação fisiológica ao longo do ramo, onde estacas provenientes de diferentes porções do mesmo ramo tendem a diferir quanto ao enraizamento (MORAES et al. 2014).

Na literatura, não são encontradas informações a respeito da propagação vegetativa para à espécie, sendo a via seminal a única forma relatada até o momento, o que torna fundamental estudar a viabilidade de uso de outras técnicas de propagação para a produção de mudas. Com base no exposto, busca-se com este estudo avaliar o potencial propagativo de *M. brauna*, por meio das técnicas de estaquia e miniestaquia visando contornar os problemas encontrados na propagação sexuada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Descrição do local

O experimento foi instalado e conduzido no viveiro florestal universitário localizado na área experimental do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira pertencente à Universidade Federal do Espírito Santo (DCFM-CCA-UFES), em Jerônimo Monteiro - ES, durante os meses de julho a outubro de 2018. A área experimental possui latitude de 20° 47' S e longitude de 41° 23' W e altitude de 120 m. O clima da região é classificado por Köppen como sendo do tipo Cwa (inverno seco e verão chuvoso), com temperatura média anual de 24,1 °C, a precipitação média anual é de 1104 mm (MAIA et al., 2007).

2.2. Estabelecimento do minijardim clonal

Conforme a técnica de miniestaquia descrita por Xavier; Wendling; Silva (2013), o minijardim clonal (Figura 2.1) foi formado a partir de minicepas obtidas por propagação sexuada (via seminal).

Com base nos resultados do Capítulo I, para a formação do minijardim clonal de *M. brauna*, foram utilizadas 250 mudas obtidas a partir de sementes provenientes da região de Linhares, ES, adubadas com a dose 8 g dm⁻³ do fertilizante de liberação controlada (FLC) Basacote® Mini 6M, com formulação 13-6-16. A baixa porcentagem de germinação das sementes da procedência de Viçosa, MG, não resultou suficiente produção de mudas para montagem do minijardim.

As mudas foram produzidas em tubetes de polipropileno de 280 cm³, com dimensões externas de 64,5 mm, internas de 52 mm e altura de 190 mm. Aos 120 dias após a semeadura, foram transplantadas para vasos com volume de 7 litros (dimensões: 33 cm altura x 16 cm largura da abertura superior x 11 cm largura da base inferior), dispostas em canaletões suspensos a 1 m de altura, preenchidos com substrato comercial (casca de Pinus, vermiculita, resíduo orgânico agroindustrial classe A, serragem de madeira, esterco – camas de equinos, NPK), com pH de 6,2, densidade de 0,5 g cm⁻³, umidade de 55%, condutividade elétrica 0,4 mS cm⁻¹, adubados com a dose de 8,0 g dm⁻³ do FLC Basacote® Mini 6M, com formulação 13-6-16, e tempo de liberação de 5 a 6 meses.

Figura 2.1 - Minijardim Clonal de *M. brauna*, localizado no viveiro florestal universitário da UFES em Jerônimo Monteiro - ES.

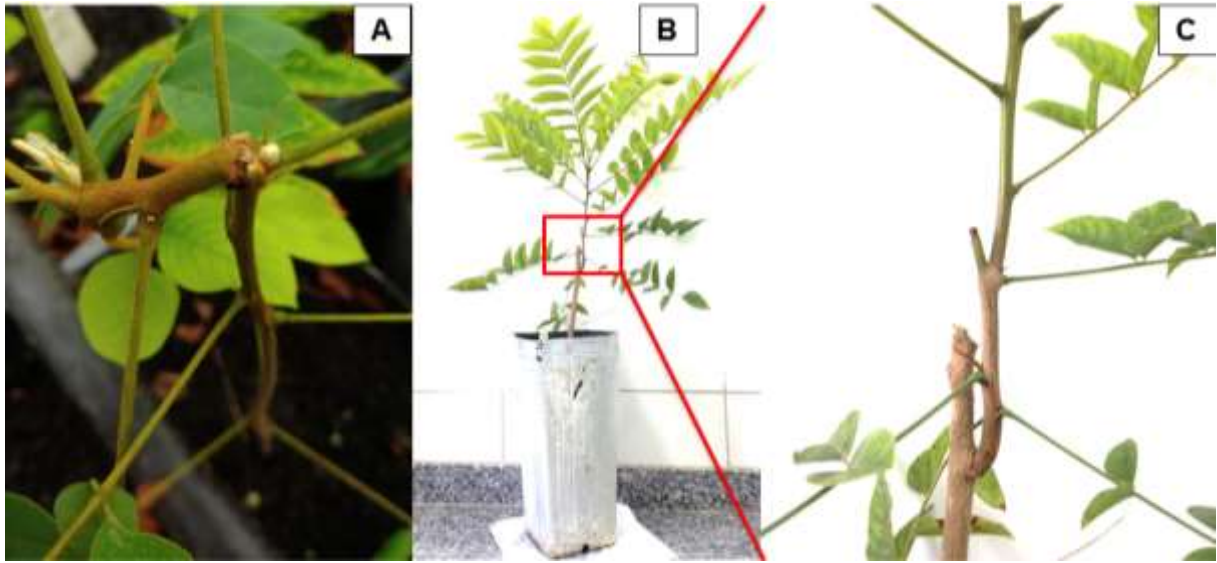


Fonte: Autora

Aos 30 dias após o transplante (período de adaptação e crescimento das mudas), efetuou-se a quebra do ápice das minicepas (Figura 2.2) a uma altura de 15 à 20 cm da base, a depender da altura dos primeiros pares de folhas, com a finalidade de reduzir a dominância apical e estimular o crescimento de brotos. Novas podas da parte aérea foram realizadas de acordo com a produtividade de brotações das minicepas, sendo estimado um intervalo entre coletas de 10 a 20 dias, num total de 5 coletas (C1: 26/02/2018; C2: 10/03/2018; C3: 26/03/2018; C4: 13/04/2018; C5: 30/04/2018), para dar a conformação do tipo taça à minicepa, e para contabilizar a produtividade das minicepas.

O manejo do minijardim clonal foi feito com irrigações diárias por gotejamento, duas vezes ao dia (duração de 2 minutos cada irrigação, com aproximadamente 5 L/m²/dia), podas seletivas de manutenção e coleta das miniestacas necessárias à experimentação (GATTI et al., 2011).

Figura 2.2 – Poda das minicepas de *M. brauna* para emissão de novas brotações.



Fonte: Autora. **A** - Quebra apical para indução de brotações; **B** - minicepa após sucessivas podas e **C** - emissão de novas brotações.

2.3. Enraizamento de miniestacas de matrizes juvenis de *M. brauna*

As brotações foram coletadas em minicepas do minijardim clonal e imediatamente acondicionadas em caixas de isopor contendo água, com o intuito de manter as boas condições de vigor e turgescência do material vegetativo até o momento do estaqueamento. A partir das brotações, foram preparadas miniestacas apicais e foliares com 6 ± 1 cm de comprimento, mantendo-se três folhas com dois pares de folíolos nas miniestacas caulinares apicais e dois pares de folíolos nas miniestacas foliares (Figura 2.3).

Previamente, as bases das estacas foram cortadas em bisel simples, desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 2 minutos, em seguida, lavadas em água corrente e tratadas com fungicida Captan 0,1% por 2 minutos (Figura 2.4).

Posteriormente, as bases das estacas foram imersas nas diferentes concentrações de AIB via pó. Para preparar 10.000 mg da solução contendo AIB a 2000, 4000, 6000 e 8000 mg kg⁻¹ utilizou-se 20, 40, 60 e 80 mg de AIB puro, respectivamente, diluindo-se em álcool absoluto, em seguida misturou-se ao talco industrial (3MgO.4SiO₂.H₂O) formando uma pasta, o qual foi colocada para secar em estufa com circulação forçada de ar a 45 °C, até evaporar todo o álcool.

Figura 2.3 – Preparo das miniestacas caulinares apicais e foliares de *M. brauna*.



Fonte: Autora. **A** - minicepa; **B** - Miniestaca caulinar apical e **C** - miniestaca foliar.

Figura 2.4 – Processo de desinfestação de miniestacas caulinares apical de *M. brauna*.



Fonte: Autora

Em seguida, as miniestacas da sexta coleta foram estaqueadas em tubetes de polipropileno com capacidade de 55 cm³, contendo substrato comercial (casca de Pinus, vermiculita, resíduo orgânico agroindustrial classe A, serragem de madeira, esterco – camas de equinos, NPK, umidade de 55%), com atenção quanto à centralização, retidão, profundidade e firmeza das estacas no tubete.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 5, testando-se dois tipos de miniestacas (caulinar apical e foliar) e cinco concentrações de AIB (0; 2000; 4000; 6000 e 8000 mg kg⁻¹), com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por 5 miniestacas, totalizando 200 miniestacas.

O estaqueamento foi feito em casa de vegetação com tela de 50% de sombreamento, com temperatura entre 25 e 30°C e umidade relativa do ar acima de 80%, por meio de um sistema de nebulização intermitente. O sistema de nebulização foi comandado por um controlador digital, conectado a um sensor de temperatura e um sensor de umidade relativa do ar. A irrigação foi acionada quando a temperatura do ar no interior da casa de vegetação ultrapassava 30 °C ou quando a umidade relativa do ar fosse inferior a 80%.

O controle fitossanitário durante o período de permanência das miniestacas na casa de vegetação foi realizado por meio de uma pulverização semanal com Benonyl (1 g L⁻¹) e Captan (1 g L⁻¹), em aplicações alternadas. As miniestacas foram mantidas em casa de vegetação durante 90 dias.

2.4. Enraizamento de estacas de matrizes adultas de *M. brauna*

As três matrizes adultas de *M. brauna* selecionadas para a coleta do material propagativo apresentavam idade aproximada de seis anos e estão localizadas em uma propriedade particular, plantadas em sistema agroflorestal com café, em Jerônimo Monteiro, ES.

As coletas dos ramos da copa das matrizes foram realizadas no mês de julho de 2018 com o auxílio de um podão no início da manhã, devido menor temperatura nesse período. Imediatamente após as coletas, os ramos foram acondicionados em caixas de isopor contendo água, com o intuito de manter em boas condições de vigor e turgescência do material vegetativo até o momento do estaqueamento. Em seguida foram preparadas estacas apicais e foliares com 6 ±1 cm de comprimento,

mantendo-se três folhas com dois pares de folíolos nas estacas caulinares apicais e dois pares de folíolos nas estacas foliares (Figura 2.5).

Previamente, as bases das estacas foram cortadas em bisel simples, desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 2 minutos, em seguida, lavadas em água corrente e tratadas com fungicida Captan 0,1% por 2 minutos.

Posteriormente, as bases das estacas foram imersas, nas diferentes concentrações de AIB via pó. Em seguida, foram estaqueadas em tubetes de polipropileno com capacidade de 55 cm³, contendo substrato comercial.

O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 2 x 5, testando-se dois tipos de estacas (apical e foliar) e cinco concentrações de AIB (0; 2000; 4000; 6000 e 8000 mg kg⁻¹), com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por 10 estacas, totalizando 400 estacas.

Figura 2.5 – Preparo das estacas caulinares apicais e foliares de *M. brauna*.



Fonte: Autora. **A** - Matriz adulta com 6 anos de idade; **B** - estaca caulinar apical e **C** - estaca foliar.

O estaqueamento foi feito em casa de vegetação com tela de 50% de sombreamento, com temperatura entre 25 e 30°C e umidade relativa do ar acima de 80%, por meio de um sistema de nebulização intermitente. As estacas foram mantidas em casa de vegetação durante 90 dias. Seguindo o mesmo controle de irrigação e fitossanitário aplicado para as miniestacas.

2.5. Avaliações

2.5.1. Produtividade das minicepas

Foi quantificada a produtividade de brotações por minicepas, ou seja, o número de brotos passivos de serem coletados em cada minicepa presente no minijardim que apresentavam ≥ 6 cm de comprimento. As coletas foram realizadas num intervalo de 10 a 20 dias, totalizando 5 coletas. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

2.5.2. Sobrevivência, enraizamento e vigor das miniestacas

As avaliações foram realizadas aos 90 dias após o estaqueamento, e foram consideradas enraizadas miniestacas vivas com raízes maiores ou iguais a 0,5 cm. As estacas não foram avaliadas por não apresentarem enraizamento.

Foram realizadas avaliações referentes à:

- Sobrevivência (S %; foi quantificado o número de plantas vivas e a taxa de sobrevivência, conforme descrito por Batista et al. (2014)),
- Porcentagem de enraizamento (E %; foi contabilizado o número de miniestacas enraizadas em relação às miniestacas estaqueadas),
- Número de raízes (NR; foram consideradas as raízes emitidas diretamente da base das miniestacas),
- Comprimento da maior raiz (CR),
- Vigor (V); As avaliações de vigor das miniestacas foram feitas de acordo com uma escala de notas, em que: 0 = Ruim: miniestacas vivas sem emissão de raiz e sem crescimento de brotações e miniestacas mortas com emissão de raiz; 2 = Bom: miniestacas sem brotações e comprimento da maior raiz inferior a 10 cm, 3 = Médio: miniestacas com brotações e comprimento da maior raiz inferior a 10 cm; 4 = Muito bom: miniestacas sem brotações e comprimento da maior raiz superior

a 10 cm e 5 = Ótimo: miniestacas com brotações e comprimento da maior raiz superior a 10 cm.

- Massa seca de raízes (MSR) e parte aérea (MSPA), as raízes e a parte aérea foram acondicionadas em sacos de papel kraft e colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, por 72 horas, sendo em seguida pesadas com balança de precisão 0,01 g.

2.5.3. Determinação do comprimento, área superficial e diâmetro das raízes

Após o período destinado ao enraizamento, as raízes foram identificadas lavadas em água corrente com auxílio de uma peneira de 30 mesh, separadas e colocadas para secar em papel absorvente. Para digitalização das imagens, as raízes, foram escaneadas com o auxílio do Epson scan. Após digitalizadas, as imagens foram submetidas ao programa SAFIRA versão 1.1 (JORGE; SILVA; RODRIGUES, 2010) para quantificação do volume (V), área superficial (AS) e diâmetro médio ponderado das raízes (DM), conforme procedimentos adotados por Freitas et al. (2005) e Partelli et al. (2006).

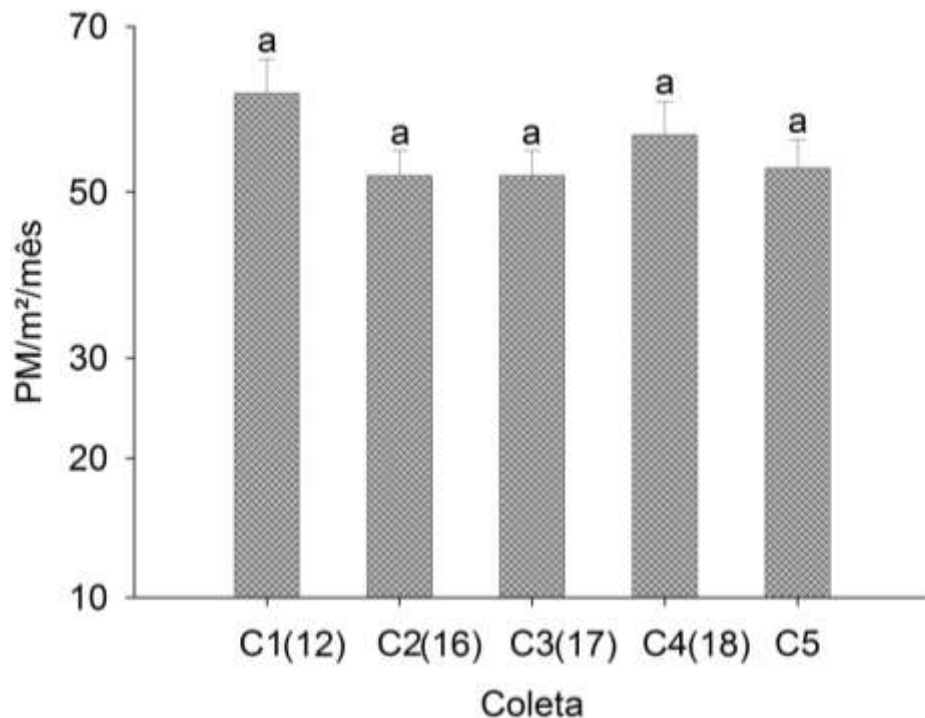
Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro Wilk). Foi necessário a transformação dos dados de S%, E% para miniestacas foliares, E% e BRT para miniestacas caulinares apicais, com uso da função $\hat{Y} = \text{raiz}(x + 0,5)$ por não apresentarem distribuição normal. Entretanto, apresentados nas tabelas na versão original. Posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, ao verificar diferenças significativas, pelo teste F a 5% de probabilidade, foi aplicado o teste de média (Teste de Tukey a 5% de probabilidade). As análises foram realizadas utilizando o software R (FERREIRA et al., 2011).

3. RESULTADOS

3.1. Produtividade do minijardim clonal de *M. brauna*

As minicepas do minijardim clonal apresentaram produtividade média de 1,1 miniestacas por minicepa por coleta, estimando-se uma produtividade de 55 miniestacas/m²/mês (Figura 2.6). A baixa produtividade de brotações foi o fator limitante na realização e condução do experimento de enraizamento de miniestacas caulinares apicais de *M. brauna*.

Figura 2.6 – Produtividade de miniestacas/m²/mês (PM/m²/mês) no minijardim clonal de *M. brauna* por coleta, com respectivos intervalos entre as coletas das brotações.



3.2. Enraizamento de miniestacas caulinares apicais de matrizes juvenis de *M. brauna*

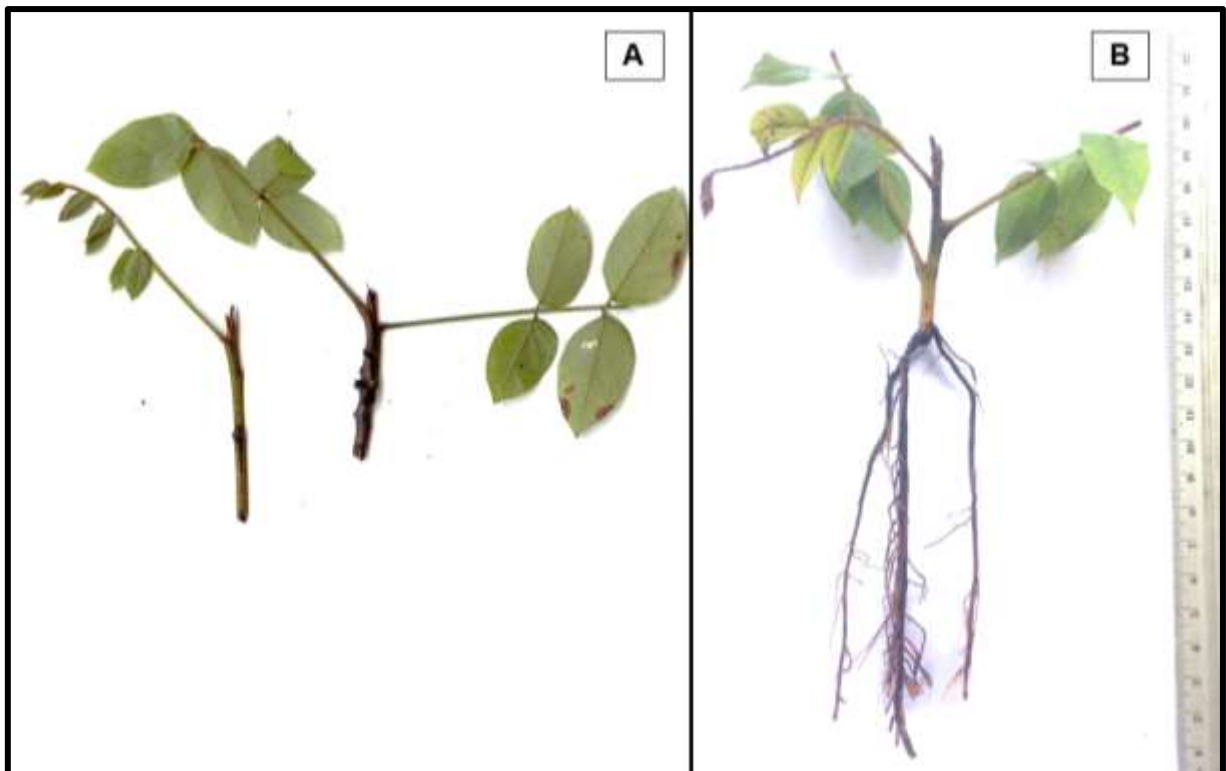
De acordo com os resultados da análise de variância (Tabela 2.1), verificou-se que as concentrações de AIB influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) as variáveis S % e E % de miniestacas caulinares apicais de *M. brauna* aos 90 dias após a instalação. Observou-se que algumas miniestacas permaneceram vivas até os 90 dias, porém não emitiram raiz, nem desenvolveram calo (Figura 2.7).

Tabela 2.1 - Resumo da análise de variância para as variáveis: porcentagem de sobrevivência (S %) e porcentagem de enraizamento (E%) de miniestacas caulinares apicais de *M. brauna* aos 90 dias em casa de vegetação.

FV	GL	Quadrados Médios	
		S (%)	E (%)
AIB	4	1670*	26,0005**
Resíduo	15	46,67	0,822
CV %		23,56	24,08
Media		29	19

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; CV%: coeficiente de variação. * e ** significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Figura 2.7 – Enraizamento de miniestaca caulinar apical de *M. brauna* aos 90 dias em casa de vegetação.



Fonte: Autora. **A** – Miniestacas caulinares apicais de *M. brauna* vivas, sem calo e sem raiz; **B** – Miniestacas enraizadas.

Verificou-se que as diferentes concentrações de AIB não influenciariam significativamente ($p > 0,05$) a maioria das variáveis relacionadas a brotos e raízes de miniestacas caulinares apicais de *M. brauna* (Tabela 2.2). A exceção das variáveis de DM e V.

Tabela 2.2 - Resumo da análise de variância para as variáveis: comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), brotos (BRT), vigor (VG), número total de raízes (NTR), diâmetro médio das raízes (DM), área superficial (AS), volume de raiz (V), massa seca parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), massa seca de total (MST) de miniestacas caulinares apicais de *M. brauna* aos 90 dias em casa de vegetação.

FV	GL	Quadrados Médios					
		CR (cm)	NR	BRT	VG	NTR	V (mm ³)
AIB	2	7,3706 ^{ns}	1,5995 ^{ns}	0,14082 ^{ns}	0,16898 ^{ns}	16,009ns	1863761 [*]
Residuo	9	10,3102	1,3079	0,11807	0,29861	13,148	329184
CV %		24,59	35,96	27,2	16,74	41,57	57,64
Média		13,06	3,18	0,708	3,26	8,72	995,44

FV	GL	Quadrados Médios				
		DM(mm)	AS (cm ²)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
AIB	2	0,136282 ^{**}	562,29 ^{ns}	0,078109 ^{ns}	0,0025241 ^{ns}	0,108534 ^{ns}
Residuo	9	0,013362	153,66	0,025249	0,0030446	0,042862
CV %		17,5	52,48	36,86	46,73	37,7
Média		0,66	23,62	0,43	0,12	0,55

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; CV%: coeficiente de variação.* e ** significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Houve diferença significativa ($p > 0,05$) das concentrações de AIB na sobrevivência das miniestacas caulinares apicais de *M. brauna*, aos 90 dias, com médias superiores para as miniestacas tratadas com AIB nas concentrações de 4000 e 8000 mg kg⁻¹ (Tabela 2.3).

As maiores porcentagens de enraizamento foram observadas nas miniestacas tratadas com o AIB nas concentrações de 4000, 6000 e 8000 mg kg⁻¹, com médias de enraizamento de 25 %, 35 % e 35% respectivamente, indicando que o AIB estimulou o sistema radicular das miniestacas de material juvenil desta espécie (Tabela 2.3).

Para a variável DM, as miniestacas tratadas com o AIB nas concentrações de 6000 e 8000 mg kg⁻¹ apresentaram médias superiores, enquanto que para a Variável V os melhores resultados foram obtidos na concentração de 8000 mg kg⁻¹. Com o aumento da concentração do hormônio AIB, houve o aumento proporcional do diâmetro médio das raízes e volume de raiz de miniestacas caulinares apicais de *M. brauna*.

Tabela 2.3 - Médias da porcentagem de sobrevivência, porcentagem de enraizamento, diâmetro médio das raízes (DM) e volume de raiz (V) de miniestacas caulinares apicais de *M. brauna*, sob diferentes doses de AIB, aos 90 dias.

AIB (mg kg ⁻¹)	S (%)	E (%)	DM (mm)	V (mm ³)
0	5 c ⁽¹⁾	0 b	-	-
2000	10 c	0 b	-	-
4000	50 a	25 a	0,47 b	568,12 b
6000	35 b	35 a	0,84 a	635,53 b
8000	45 ab	35 a	0,67 ab	1782,68 a

(1) Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3. Enraizamento de miniestacas foliares de matrizes juvenis de *M. brauna*

As concentrações de AIB influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) as variáveis S % e E % de miniestacas foliares de *M. brauna* aos 90 dias após o estaqueamento (Tabela 2.4). Observou-se que algumas miniestacas enraizaram, porém aos 90 dias, estavam mortas, fato que justifica menor porcentagem de sobrevivência e maior porcentagem de enraizamento.

Tabela 2.4 - Resumo da análise de variância para as variáveis: porcentagem de sobrevivência (S %) e porcentagem de enraizamento (E%) de miniestacas caulinares apicais de *M. brauna* aos 90 dias em casa de vegetação.

FV	GL	Quadrados Médios	
		S (%)	E (%)
AIB	4	12,4970**	14,6197**
Resíduo	15	0,6223	1,0826
CV %		27,83	34,18
Media		10	12

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; CV%: coeficiente de variação. * e ** significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

As diferentes concentrações de AIB não influenciariam significativamente ($p > 0,05$) as variáveis CR, VG, e DM, de miniestacas foliares de *M. brauna* (Tabela 2.5). Exceto as variáveis de NR, NTR, AS, V e MSR.

As maiores porcentagens de sobrevivência e de enraizamento de miniestacas foliares de *M. brauna* foram observadas nas miniestacas tratadas com o AIB nas concentrações de 4000, 6000 e 8000 mg kg⁻¹, com medias de sobrevivência variando de 10 % a 25 e enraizamento de 15 % a 27,5 %, respectivamente,

indicando que o AIB estimulou o sistema radicular das miniestacas foliares de matrizes juvenis desta espécie (Tabela 2.6).

Tabela 2.5 - Resumo da análise de variância para as variáveis: comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), vigor (VG), número total de raízes (NTR), diâmetro médio das raízes (DM), área superficial (AS), volume de raiz (V) e massa seca de raízes (MSR) de miniestacas foliares de *M. brauna* aos 90 dias em casa de vegetação.

FV	GL	Quadrados Médios			
		CR	NR	VG	NTR
AIB	2	5,2019 ^{ns}	5,1458	0,05333 ^{ns}	112,142 ^{**}
Residuo	9	19,8107	0,7917	0,74778	8,006
CV %		46,54	42,71	37,33	50,75
Média		9,56	2,08	2,32	5,58

FV	GL	Quadrados Médios			
		V	MSR	DM	AS
AIB	2	448160 ^{**}	0,00224305 ^{**}	0,11662 ^{ns}	439,49 ^{**}
Residuo	9	42841	0,00012149	0,03730	51,14
CV %		45,21	30,08	30,23	49,71
Média		457,80	0,04	0,64	14,39

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; CV%: coeficiente de variação.* e ** significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

As miniestacas foliares tratadas com o AIB nas concentrações de 6000 e 8000 mg kg⁻¹ apresentaram médias superiores para as variáveis NR, AS, V, e MSR enquanto que para a Variável NTR os melhores resultados foram obtidos na concentração de AIB de 8.000 mg kg⁻¹(Tabela 2.6).

Tabela 2.6 - Médias da porcentagem de sobrevivência (S%) e de enraizamento (E%), número de raízes (NR), número total de raízes (NTR), volume de raiz (V), área superficial (AS) e massa seca de raízes (MSR) de miniestacas foliares de *M. brauna*, sob diferentes concentrações de AIB.

AIB (mg kg ⁻¹)	S (%)	E (%)	NR	NTR	V	AS	MSR
0	0 b ⁽¹⁾	0 b	-	-	-	-	-
2000	0 b	0 b	-	-	-	-	-
4000	10 ab	15 ab	1,25 b	1 b	96,20 b	3,13 b	0,01b
6000	25 a	27,5 a	1,62 ab	4,35 b	520,37 a	16,17 ab	0,05 a
8000	15 ab	17,5 ab	3,37 a	11,38 a	756,82 a	23,86 a	0,06 a

(1) Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 2.8 - Miniestaca foliar de *M. brauna* enraizada aos 90 dias em casa de vegetação.



Fonte: Autora

3.4. Enraizamento de estacas caulinares apicais e foliares de matrizes adultas de *M. brauna*

Aos 90 dias após o estaqueamento de estacas foliares da copa de matrizes de *M. brauna*, observou-se a queda total dos folíolos e a mortalidade das mesmas. As estacas caulinares apicais, assim como as estacas foliares, não apresentaram nenhum percentual de enraizamento, não houve a presença de calos e nem de brotos. Com base nos resultados podemos inferir que a estaquia caulinar apical e foliar de material adulto, quando retirado da copa da árvore, não é propícia para a propagação vegetativa da espécie estudada em função das concentrações de AIB aplicadas (Figura 2.9).

Figura 2.9 - A – estacas foliares de matrizes adultas de *M. brauna* aos 90 dias em casa de vegetação; B – miniestacas caulinares apicais.



Fonte: Autora

4. DISCUSSÃO

Ao se analisar os resultados da produtividade de brotações em coletas sucessivas das minicepas, é possível inferir a viabilidade técnica do uso do sistema de minijardim clonal adotado no presente estudo, visando à produção de mudas de *M. brauna* durante o ano todo. Com uma produtividade estimada de 55 miniestaca/m²/mês, a produção de mudas por miniestacas advindas do minijardim clonal pode se constituir como uma importante alternativa de reprodução, uma vez que a semente da espécie é um insumo limitado, e apresenta problemas de viabilidade e/ou armazenamento, reduzindo a porcentagem de emergência, conforme relatado por Corte et al. (2010), que houve a redução da porcentagem de germinação de sementes de *M. brauna* com o aumento do tempo de armazenamento.

Durante o acompanhamento da produtividade das minicepas, observou-se que após cada coleta de brotos realizada, apenas um ou dois brotos formados nas posições superiores das minicepas apresentavam crescimento, os brotos formados nas posições basais iniciavam o crescimento, porém morriam com poucos centímetros de comprimento. Este comportamento das brotações de *M. brauna* ocorreu, provavelmente, em resposta a uma forte dominância apical de brotos superiores nas minicepas, inibindo o crescimento dos brotos inferiores. Essa característica também foi observada em minicepas de *Toona ciliata* (SOUZA et al., 2009). e *Peltophorum dubium* (MANTOVANI et al., 2017) cultivadas em minijardim clonal.

A dominância apical, segundo Taiz e Zeiger (2017), está relacionada com fatores endógenos nutricionais e com substâncias reguladoras de crescimento, principalmente as auxinas e citocininas, sendo que essa dominância pode ser quebrada com a poda do ápice da planta eliminando a fonte principal de auxina e modificando o gradiente desta ao longo do caule da planta, promovendo assim, o crescimento das gemas axilares basais. Como superação das dificuldades encontradas na quebra da dominância apical para a *M. brauna*, sugere-se a realização de estudos que avaliem a emissão e crescimento de brotos em minicepas submetidas a tratamentos de quebra do ápice em diferentes alturas. Outra alternativa seria a aplicação de diferentes concentrações do regulador de crescimento TIBA. Estudos realizados por Cavalcanti Filho et al. (2015) com *Coffea*

arábica, observaram que o fornecimento de TIBA proporcionou um aumento de 312,5% no número de brotos comparado ao tratamento controle, que não recebeu nenhum regulador de crescimento.

Em relação às variáveis relacionadas ao enraizamento de miniestacas caulinares apicais e foliares de *M. brauna*, valida-se a hipótese que a aplicação de AIB potencializa o enraizamento de miniestacas. Sendo que as doses 6000 e 8000 mg kg⁻¹ testadas apresentaram melhores médias, o que sinaliza, que podem haver ganhos ainda maiores no enraizamento de miniestacas desta espécie com aplicação de concentrações mais elevadas de AIB.

Observa-se que, nas condições deste experimento as miniestacas caulinares apicais oriundas de mudas produzidas por sementes mostraram-se mais propensas ao enraizamento adventício, fato esse que pode ser explicado devido a maior juvenilidade do material. Essa capacidade de enraizamento das miniestacas caulinares apicais pode também ser explicada pelo fato de que as auxinas são sintetizadas, principalmente, em regiões de crescimento ativo, como gemas terminais e primórdios foliares, o que contribui para a elevação dos níveis endógenos desse hormônio nas estacas, refletindo em maior potencial de enraizamento (BORGES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

As maiores porcentagens de DM, e V, foram observadas nas miniestacas tratadas com AIB nas concentrações de 6000 e 8000 mg kg⁻¹, indicando que o uso do AIB estimulou o sistema radicular das miniestacas de material juvenil desta espécie. Essas variáveis são utilizadas para avaliar o enraizamento de miniestacas caulinares apicais de *M. brauna* e podem estar correlacionados com a sobrevivência e o crescimento das plântulas no campo. Sob a concepção de recuperação de áreas degradadas, mudas vigorosas, com sistema radicular mais desenvolvido, tem maior probabilidade de sobreviver e crescer mais rápido em condições adversas de campo.

Durante o período de permanência na casa de vegetação observou-se que as miniestacas foliares de matrizes juvenis apresentaram um bom crescimento radicular, entretanto não houve emissão da parte aérea. De Moraes et al. (2014) também observaram que não houve crescimento e desenvolvimento da parte aérea das estacas foliares de *Toona ciliata*, indicando a inaptidão destes tipos de tecidos vegetais em desenvolver novos meristemas caulinares nas condições desse experimento. Porém o potencial de enraizamento das estacas foliares confirma a

importância da presença de folhas nas estacas caulinares (BETANIN; NIENOW, 2010). Hartmann et al. (2011), ressalta que a presença de folhas pode proporcionar melhor enraizamento, pois são fontes de promotores de enraizamento.

Para a porcentagem de estacas e miniestacas enraizadas, observou-se que a espécie possui potencialidade para a propagação vegetativa por miniestaquia de matrizes juvenis, e com isso podemos inferir que a capacidade de enraizamento da espécie é fortemente influenciada pela juvenilidade do material. Segundo Wendling; Trueman; Xavier, (2014), o baixo índice de enraizamento adventício de estacas oriundas de árvores adultas pode ocorrer em virtude da diminuição da capacidade de formar raízes com o aumento da idade, pois, ramos maduros tendem a ter menor concentração de auxina devido a maior idade ontogenética.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a viabilidade de propagação vegetativa de *M. brauna* pela técnica de miniestaquia a partir de material juvenil, fazendo-se aplicação de regulador de crescimento (AIB) para estímulo do enraizamento, nas concentrações 6000 e 8000 mg kg⁻¹ testadas.

5. CONCLUSÃO

A *Melanoxylon brauna* apresenta potencial de enraizamento quando propagada vegetativamente por miniestacas caulinares apicais de matrizes juvenis.

As concentrações de AIB influenciam nas respostas ao enraizamento de miniestacas caulinares apicais de matrizes juvenis, bem como na qualidade do sistema radicial caracterizado pelas variáveis DM e AS, principalmente nas concentrações de 6000 e 8000 mg kg⁻¹.

A propagação de miniestacas foliares não é viável por não desenvolverem a parte aérea.

As estacas foliares e caulinares apicais de brotações da copa de matrizes adultas não apresentaram enraizamento aos 90 dias na casa de vegetação.

6. REFÊRENCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 500p.

BATISTA, A. F. et al. Influência do sistema de corte basal de miniestacas na propagação clonal de híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* subsp. *maidenii*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 6, p. 1115-1122, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622014000600016>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

BETANIN, L.; NIENOW, A. A. Propagação vegetativa da corticeira-da-serra (*Erythrina falcata* Benth.) por estaquia caular e foliar. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 871-880, 2010. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2513/6682>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n.º 443, de 14 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2014. Seção 01, p. 121. Disponível em: <<http://sintse.tse.jus.br/documentos/2014/Dez/18/portaria-no-443-de-17-de-dezembro-de-2014>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**, v. 4. Brasília, DF: Embrapa Florestas, 2010, 644p.

CAVALCANTI FILHO, P. F. M. et al. Efeito de reguladores de crescimento na brotação e enraizamento de miniestacas de *Coffea arabica* L. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 9., 2015, Curitiba. **Anais**. Curitiba: Embrapa Café, 2015. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/4143>. Acesso em: 13 jan. 2019.

CORTE, V. B. et al. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 83-91, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222010000100010>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

DE MORAES, D. G. et al. Enraizamento de miniestacas caulinares e foliares juvenis de *Toona ciliata* M. Roemer. **MAGISTRA**, v. 26, n. 1, p. 47-54, 2014. Disponível em: <<https://magistraonline.ufrb.edu.br/index.php/magistra/article/view/437>>. Acesso em: 22 jan. 2019

DIAS, P. C. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, v.1, n. 1, p.1-9. 2011.

FREIRE, J. M. et al. Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em área fragmentada de Mata Atlântica em Itaboraí, RJ. **Pesquisa Florestal Brasileira**,

Colombo, v. 33, n. 75, p. 243-252, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4336/2013.pfb.33.75.454>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

FREITAS, T. A. S. et al. Desempenho radicular de mudas de eucalipto produzidas em diferentes recipientes e substratos. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 853–861, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622005000600003>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

GATTI, K. C. et al. Propagação vegetativa de Jequitibá (*Cariniana estrellensis* (Raddi) por miniestaqueia. **Temas Agrários**, Montería, v. 16, n. 2, p. 54-63, 2011. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4149593.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011. 900 p.

JORGE, L. A. C.; SILVA, D. J. C. B.; RODRIGUES, A. F. O. **Safira**: Software para a análise de fibras e raízes. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010. Disponível em: <<http://www.cnpdia.embrapa.br/downloads/safira/>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v.1, 368p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. v.1. 368p

MAIA, A. R.; LOPES, J. C.; TEIXEIRA, C. O. Efeito do envelhecimento acelerado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de trigo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 678-684, 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/240771945_Efeito_do_envelhecimento_a_celerado_na_avaliacao_da_qualidade_fisiologica_de_sementes_de_trigo>. Acesso em: 29 set. 2018.

MANTOVANI, N. et al. Cultivo de Canafístula (*Peltophorum dubium*) em minijardim clonal e propagação por miniestacas. **Ciência Florestal**. vol. 27 n. 1, p. 225-236, 2017. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/26461>>. Acesso em: 03 jan. 2019.

MORAES, D. G. et al. Enraizamento de miniestacas caulinares e foliares juvenis de *Toona ciliata* M. Roemer. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 26, n. 1, p. 47- 54, 2014.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. 1 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 52p.

PARTELLI, F. L. et al. Produção e desenvolvimento radicular de plantas de café 'Conilon' propagadas por sementes e por estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 949-954, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000600008>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

SOUZA, J. C. A. V. de. et al. Propagação Vegetativa de Cedro Australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por Miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.2, p.205-213, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v33n2/a02v33n2.pdf>>. Acesso em: 03 jan 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 6^oed, Artmed, Porto Alegre, 2017.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, San Francisco, v.1, p.1-23, 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11056-014-9421-0>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

XAVIER, A. et al. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, p. 139-143, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622003000200003>>. Acesso em: 06 mar 2018.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal** - Princípios e Técnicas. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. 280 p.

**Capítulo 3 DIVERSIDADE GENÉTICA DE MINICEPAS ESTABELECIDAS EM UM
MINIJARDIM CLONAL DE *Melanoxylon brauna***

RESUMO

Melanoxylon brauna é uma espécie arbórea nativa da mata atlântica que tem grande potencial para reflorestamentos e arborização urbana. Diante de sua exploração, a falta de replantios e as dificuldades de germinação, encontra-se na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável, despertando o interesse por estudos que visam sua conservação. Os marcadores moleculares tem se destacado como ferramentas interessantes para esses estudos, visando o mapeamento de genes, análise de diversidade genética e estudos evolutivos. Desta forma, objetivou-se avaliar a diversidade e estrutura genética em minijardim clonal de *M. brauna*. Para a análise de diversidade genética do minijardim clonal foi coletado material vegetal de 59 indivíduos, os quais foram analisados por meio de onze *primers* ISSR, gerando 183 fragmentos, sendo 117 polimórficos (63,93%). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para os marcadores revelou média de 0,36, caracterizando-os como moderadamente informativos. O número de locos utilizados ($n = 117$) foi maior do que o estabelecido como número ótimo ($n = 113$), indicando precisão nas análises. Constatou-se alta diversidade genética, fundamentada nos valores do índice de diversidade de Nei ($H' = 0,366$), índice de Shannon ($I = 0,5450$) e pela formação de grupos distintos pelo método UPGMA. Por meio do dendrograma foi possível distinguir um grupo com a maioria dos indivíduos (47 genótipos), cinco grupos com dois genótipos e dois grupos com um genótipo cada, inferindo que os indivíduos não são idênticos, geneticamente. Com este estudo foi possível verificar que os marcadores ISSR mostraram-se eficientes para caracterização da diversidade genética em indivíduos de *M. brauna*, e que a população do minijardim clonal pode ser utilizada como fonte de propágulos para a produção de mudas com maior variabilidade genética.

Palavras-chave: Propagação assexuada, Conservação da biodiversidade, Floresta Atlântica, Espécies florestais.

ABSTRACT

Melanoxylon brauna is a native forest species of the Atlantic Forest that has great potential for reforestation and urban afforestation. Due to its exploitation, the lack of replanting and the germination difficulties, it is in the list of species of the Brazilian flora threatened with extinction, in the category vulnerable, arousing the interest for studies that aim at its conservation. Molecular markers have been highlighted as interesting tools for these studies, aiming at gene mapping, genetic diversity analysis and evolutionary studies. In this way, the aim was to evaluate the genetic diversity and structure in a mini-clonal hedge of *M. brauna*. For the genetic diversity of the mini-clonal hedge analysis, were collected 59 individuals which were analyzed by eleven ISSR primers, generating 183 fragments, where 117 were polymorphic (63.93%). The polymorphic information content (PIC) for the markers revealed an average of 0.36, characterizing them as moderately informative. The number of loci used ($n = 117$) was higher than that established as the optimal number ($n = 113$), indicating precision in analyzes. It was verified a high genetic diversity, based on the values of the Nei's gene diversity index ($H' = 0.366$), Shannon diversity index ($I = 0.5450$) and the formation of distinct groups by the UPGMA method. Through the dendrogram it was possible to distinguish one group with the majority of individuals (47 genotypes), five groups with two genotypes and two groups with one genotype each, inferring that individuals are not genetically identical. With this study it was possible to verify that ISSR markers were efficient for the characterization of genetic diversity in *M. brauna* individuals and that the mini-clonal hedge population can be used as a source of propagules for the production of seedlings with greater genetic variability.

Keywords: Asexual propagation, Biodiversity conservation, Atlantic Forest, Forest species.

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica é apontada como um dos hotspots mundiais, em virtude da ocorrência de um grande número de espécies endêmicas e ameaçadas (PINTO et al., 2006). Segundo Costa (2012) a intensa degradação desse bioma, causada pela ocupação territorial e exploração desordenada dos recursos naturais, promoveu a redução da cobertura vegetal natural. Esse processo de fragmentação tem direcionado para a diminuição da abundância de espécies vegetais, com consequente redução da variabilidade genética despertando o interesse por estudos que visam estabelecer estratégias de conservação dos recursos genéticos de espécies nativas desse bioma (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2017).

Dentre as espécies nativas da Floresta Atlântica, afetadas com processo de fragmentação, destaca-se a *Melanoxylon brauna* Schott, espécie arbórea pertencente à família Fabaceae, que devido sua intensa exploração, encontra-se na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (BRASIL, 2014). Segundo Carvalho et al. (2007) a *M. brauna* raramente tem sido inventariada em levantamentos florísticos, fato que coloca em risco sua conservação.

A propagação da *M. brauna* via seminal é limitada quanto á produção de mudas, devido a problemas de viabilidade e/ou armazenamento das sementes e dificuldade em localizar matrizes para a coleta de sementes. No entanto, uma alternativa para a superação dessas dificuldades é avaliar a aptidão a propagação vegetativa por meio da técnica de miniestaquia para a produção de mudas. Essa técnica possibilita a formação e condução de um banco de matrizes em uma área reduzida (adoção do minijardim clonal) (FERRIANI et al., 2011).

A formação do minijardim clonal como fonte de material vegetativo para a produção de mudas, apresenta grandes vantagens por permitir a redução da área para a produção inicial, a redução no tamanho das estacas, redução nos custos com transporte e coleta das brotações e maior eficiência das atividades de manejo (DIAS et al., 2012). Quando as minicepas do minijardim clonal são formadas via seminal, o material propagativo torna-se mais diversificado para a produção de mudas, possibilitando a conservação da espécie, além de permitir a produção de mudas durante o ano todo (OLIVEIRA et al., 2016).

A caracterização da diversidade genética em espécies com risco de extinção pode fornecer dados uteis para a identificação e seleção de genótipos em

programas de conservação (GONÇALVES et al., 2014). Uma forma para verificarmos a existência de variabilidade genética no minijardim clonal é fazendo uso de marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares do tipo *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) (ZIETKIEWICZ, RAFALSKY E LABUDA, 1994), estão sendo amplamente empregado para estudos de diversidade genética em espécies florestais. Esses marcadores moleculares não necessitam de informações prévias do genoma da espécie, revelando padrões altamente polimórficos, sendo que os procedimentos laboratoriais podem ser aplicados para qualquer espécie vegetal (NG; TAN, 2015). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade e estrutura genética em minicepas estabelecidas em um minijardim clonal de *M. brauna*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção e obtenção do material para a caracterização genética

As folhas de *M. brauna* utilizadas para a extração de DNA foram coletadas aleatoriamente de 59 indivíduos (minicepas), de um total de 220, mantidos em minijardim clonal (Figura 3.1), localizado na área experimental do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, pertencente à Universidade Federal do Espírito Santo (DCFM-UFES), no município de Jerônimo Monteiro, ES (20°47'47.2"S, 41°24'22.6"W).

Figura 3.1 - Minijardim clonal de onde foi coletado material vegetativo de *M. brauna*.



Fonte: Autor

As sementes de *M. brauna* utilizadas para a produção das minicepas e formação do minijardim clonal foram coletadas no município de Linhares, Espírito Santo, Brasil, adquiridas via comercialização realizada por empresa registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Informações climáticas de Linhares, ES

Município	Classificação Köppen, (1948)	Precipitação média (mm ano ⁻¹)	Dias com precipitação ao ano	Temperatura média compensada	Altitude média	Umidade relativa (%)	Horas de brilho solar
Linhares	Aw	1.267	116	24,0	33	83	2.182,3

Fonte: Adaptado INMET (2018).

O material coletado foi devidamente identificado e armazenado em sacos de papel contendo sílica-gel, com o intuito de minimizar o processo de oxidação do DNA. Em seguida, foram encaminhados ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (BqMol) do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, CCAE/UFES, Alegre, ES, onde as análises foram realizadas.

2.2. Extração de DNA

Foram coletadas preferencialmente folhas jovens e com boa qualidade fitossanitária. Posteriormente as amostras foram embaladas em papel alumínio e armazenadas em freezer a -30 °C por no mínimo 24 horas a fim de prepará-las para a liofilização (Liofilizador L108 da Liobras), processo no qual as amostras congeladas são desidratadas, impedindo a oxidação.

O DNA foi obtido a partir do protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações propostas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), adequado para espécies vegetais com altas concentrações de polissacarídeos. Aproximadamente 300 mg de tecido liofilizado por amostra foi triturado em graol com ajuda de um pistilo de porcelana, acondicionados em microtubos de 2 mL e incubado a 65°C por 30 minutos com 700 µL de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 mM NaCl; 20 mM EDTA pH 8,0; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% PVP; 0,2% β-mercaptoetanol).

Após a retirada do banho-maria adicionou-se 650 µL de Clorofórmio-Álcool Isoamílico (CIA - 24:1) e homogeneizou-se manualmente por 10 minutos, em seguida, centrifugou-se a 12000 RPM (centrífuga Pico 21 da *Thermo Scientific*, raio de 7,5 cm) por 10 minutos. Transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo de 2 mL e adicionou-se 200 µL de tampão de extração juntamente com 650 µL de CIA, uma nova homogeneização foi realizada e em seguida foram centrifugadas a 12000

RPM por 10 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida, porém, para um microtubo de 1,5 mL onde se adicionou 650 μL de CIA e centrifugou-as a 12000 RPM por 10 minutos.

Na etapa final da extração de DNA, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, e adicionou-se um volume de isopropanol gelado e 230 μL de acetato de amônio. Centrifugou-se a 12000 RPM por mais 10 minutos para que ocorresse a precipitação do DNA. O precipitado gerado passou por tríplice lavagem com 250 μL de etanol 70 % e posto para secar. Posteriormente, o DNA foi ressuscitado em 50 μL de TE + RNase e colocado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

Após as extrações, a quantificação do DNA foi feita com uso do espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Scientific* 2000C), a fim de determinar a concentração e a pureza das amostras. O parâmetro adotado para definição da pureza das amostras de DNA foi à relação A_{260}/A_{280} , considerado ideal quando dentro do intervalo de 1,8 a 2,0 (BARBOSA, 1998).

A partir da quantificação foi feita a diluição, para manipulação cotidiana, das amostras de DNA em água ultra pura para a concentração de 10 ng μL^{-1} , onde foram mantidas em freezer -20°C. Os microtubos de DNA total restante foram armazenados em freezer -30°C.

2.3. Amplificações ISSR

Inicialmente, foram testados 24 *primers* ISSR para seleção dos mais informativos. Para a realização dos testes foram utilizadas amostras de DNA de quatro indivíduos de *M. brauna* (Tabela 3.2).

As reações em cadeia de polimerase (PCR) foram compostas pela seguinte combinação de reagentes: tampão 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5 e 50 mM de KCl), 2,5 mM de MgCl_2 , 0,25 mM de cada dNTP, 0,2 μM de *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase e cerca de 10ng de DNA genômico. As PCRs foram realizadas no termociclador Veriti® (*Applied Biosystems*) com as seguintes etapas: desnaturação a 94 °C, por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C, por 45 s, anelamento de 52 °C, por 45 s, e 72 °C, por 90 s, com extensão final de 72 °C, por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, com tampão TBE 1X (10,8 g L^{-1} de Tris-base; 5,5 g L^{-1} de Ácido Bórico; 0,83 g L^{-1} de EDTA) numa voltagem de 100 Volts, por aproximadamente 5 horas.

Após a separação dos fragmentos, os géis foram banhados em solução de brometo de etídio ($0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 40 min, lavados em água corrente para a remoção do excesso de brometo e em seguida foram fotografados sob luz UV em fotodocumentador (ChemiDoc MP *Imaging System* – Bio Rad®), permitindo a distinção entre presença e ausência de bandas, além do tamanho dos fragmentos com auxílio do marcador de peso molecular *Ladder* 100bp.

Tabela 3.2. *Primers* ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia e suas respectivas sequências, testados em amostras *M. brauna*, cultivadas em minijardim clonal.

<i>Primer</i>	Sequências (5'-3')
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT
UBC 814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
UBC 822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC 866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
UBC 868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
UBC 876	GAT AGA TAG ACA GAC A
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG

* A = Adenina; T = Timina; C = Citosina; G = Guanina; H = (A, T ou C); R = (A ou G); V = (A, C ou G) e Y = (C ou T).

2.4. Análises dos dados moleculares

Foi realizada análise visual dos géis fotodocumentados, os quais permitiram observar os padrões de bandas gerados em cada *primer*. Bandas que ocuparam a mesma posição para os 59 indivíduos selecionados indicaram amplificação do mesmo fragmento de DNA, sendo classificados como monomórficos para o loco

observado, porém, as bandas que ocuparam posições distintas classificaram-se como polimórficas.

Os fragmentos gerados por marcadores ISSR foram utilizados para gerar uma matriz de dados binários onde: presença de fragmentos (1) ou ausente (0). Para dados perdidos, gerados por não amplificação, foram atribuídos valores e símbolos diferentes de acordo com o software utilizado. Com base na leitura da matriz binária de presença/ausência foi possível realizar uma análise descritiva dos dados, envolvendo número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer* e a faixa de variação de tamanho dos locos em pares de bases (TPB).

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada loco ISSR foram calculados conforme o proposto por Roldan-Ruiz et al. (2000).

A matriz binária foi submetida a análises, com aplicações intrapopulacionais. Deste modo, para determinar o número ótimo de locos polimórficos necessários para a caracterização da diversidade genética neste estudo, foi realizada a análise de *bootstrap* utilizando-se o software GENES (CRUZ, 2013). Foram realizadas simulações para cada par de indivíduos por meio das estimativas de correlação (r) entre os valores da matriz de similaridade original e a matriz simulada com diferentes números de fragmentos. O valor de estresse (E), que indica o ajuste entre as matrizes também foi calculado.

Foram estimados os coeficientes de dissimilaridade entre os genótipos com base na complementariedade do coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1901). Os valores da dissimilaridade entre os indivíduos foram utilizados na análise de agrupamento, por meio do método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA).

Após o agrupamento, para determinação do número de grupos formados, estimou-se, pelo método de Mojema (1997), o ponto de corte (P_c), cuja fórmula é descrita como $P_c = m + kdp$, sendo m = a média dos valores de distância dos níveis de fusão correspondentes aos estágios; $k = 1,25$; dp = desvio padrão, que determinou a semelhança e divergência molecular entre os indivíduos, além da formação de grupos geneticamente distintos.

Foi calculado também o coeficiente de correlação cofenética (CCC) entre a matriz de dissimilaridade genética e a matriz dos valores cofenéticos a fim de

verificar a consistência do agrupamento. Todas estas análises foram realizadas utilizando o programa GENES (CRUZ, 2013).

Outro parâmetro utilizado na inferência do número de grupos (K), nos quais os genótipos encontram-se estruturados, foi a partir da abordagem bayesiana utilizando o programa STRUCTURE 2.3 (PRITCHARD et al., 2000). Foram realizadas 20 corridas para cada valor de K, onde o número de grupos estabelecidos (K) foi de $K = 1$ a $K = 4$, com 1.000.000 interações de Monte Carlo, via Cadeias de Markov (MCMC) com um descarte inicial (*burn-in*) de 250.000 interações. O número de grupos genéticos foi estimado pelo maior valor de $\text{LnP}(k)$ e o menor desvio padrão usando o software STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012).

A matriz binária foi analisada utilizando o programa POPGENE (YEH et al., 1997) para estimar os parâmetros de diversidade genética, tais como número de alelos observados (N_a), número de alelos efetivos (N_e), diversidade genética de Nei (H') (NEI, 1978) e índice de Shannon (I) (SHANNON; WIEVER, 1949).

3. RESULTADOS

3.1. Seleção de *Primers* ISSR

Dos 24 *primers* ISSR testados (Tabela 3.2), 11 foram selecionados por serem mais polimórficos e por apresentarem fragmentos nítidos e bem definidos (Tabela 3.3; Figura 3.2), gerando um total de 183 locos. O número de locos por *Primer* variou entre 14 (UBC 807 e UBC 811) a 21 (UBC 809), com uma média de 16,64 locos. Dos 183 locos obtidos, 117 foram polimórficos, resultando em um percentual de 63,93% de polimorfismo.

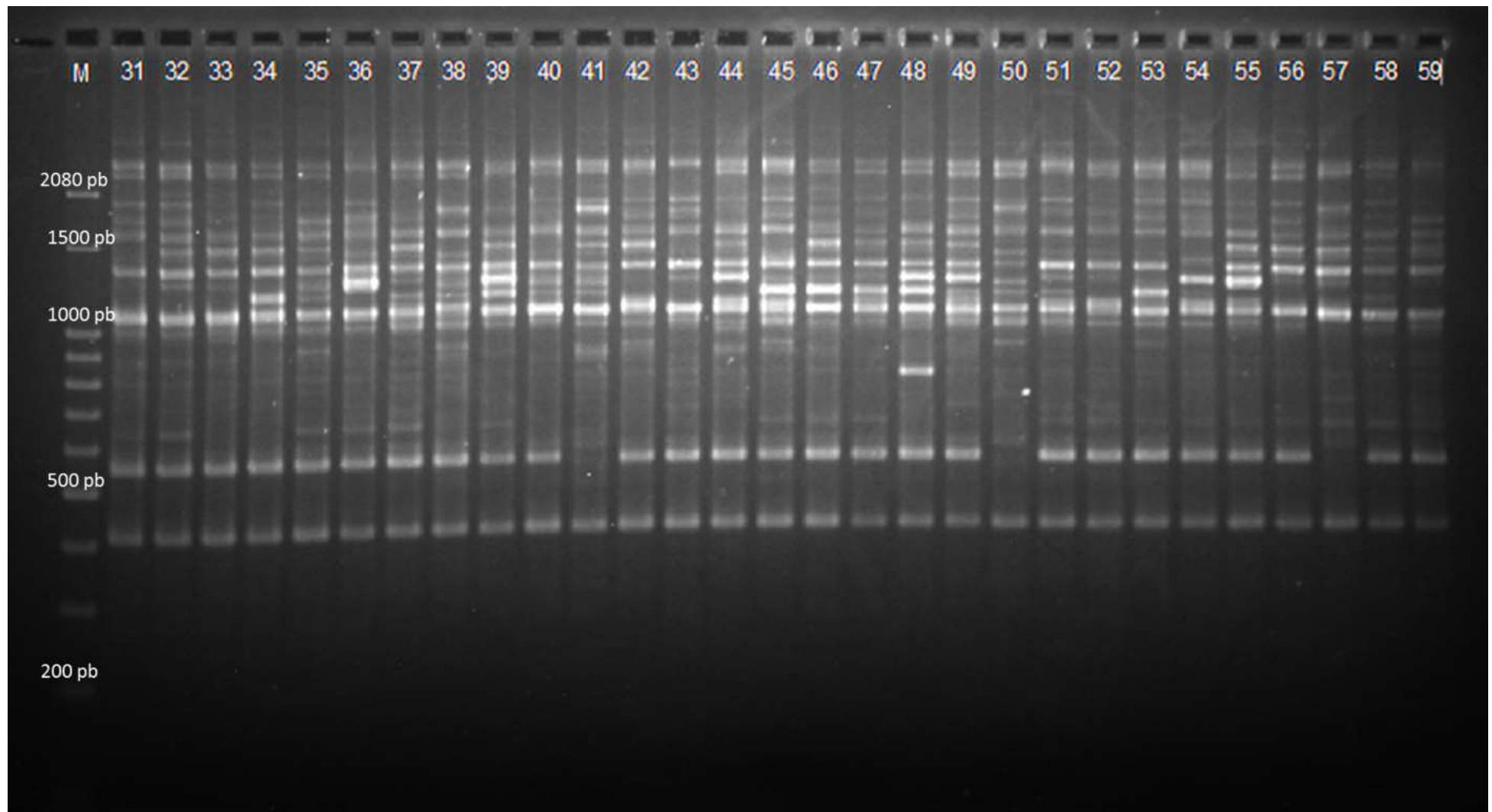
Dentre os 11 *primer*, o UBC 813 se destaca por revelar a maior porcentagem de bandas polimórfica (87,50%), em um total de 16, seguido pelo *primer* UBC 855 (83,33%) em 18 bandas (Tabela 3.3). O *primer* UBC 811 foi o menos informativo, em um total de 14 bandas apenas 3 foram polimórficas (21,43%).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou entre 0,29 (UBC 811) a 0,40 (UBC 809, UBC 812 e UBC 855), com valor médio de 0,36 (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. *Primers* ISSR selecionados para *M. brauna* com o peso molecular estabelecido com base em marcador de 100pb (PM) máximo e mínimo dos fragmentos obtidos, número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer*, e conteúdo da informação de polimorfismo (PIC).

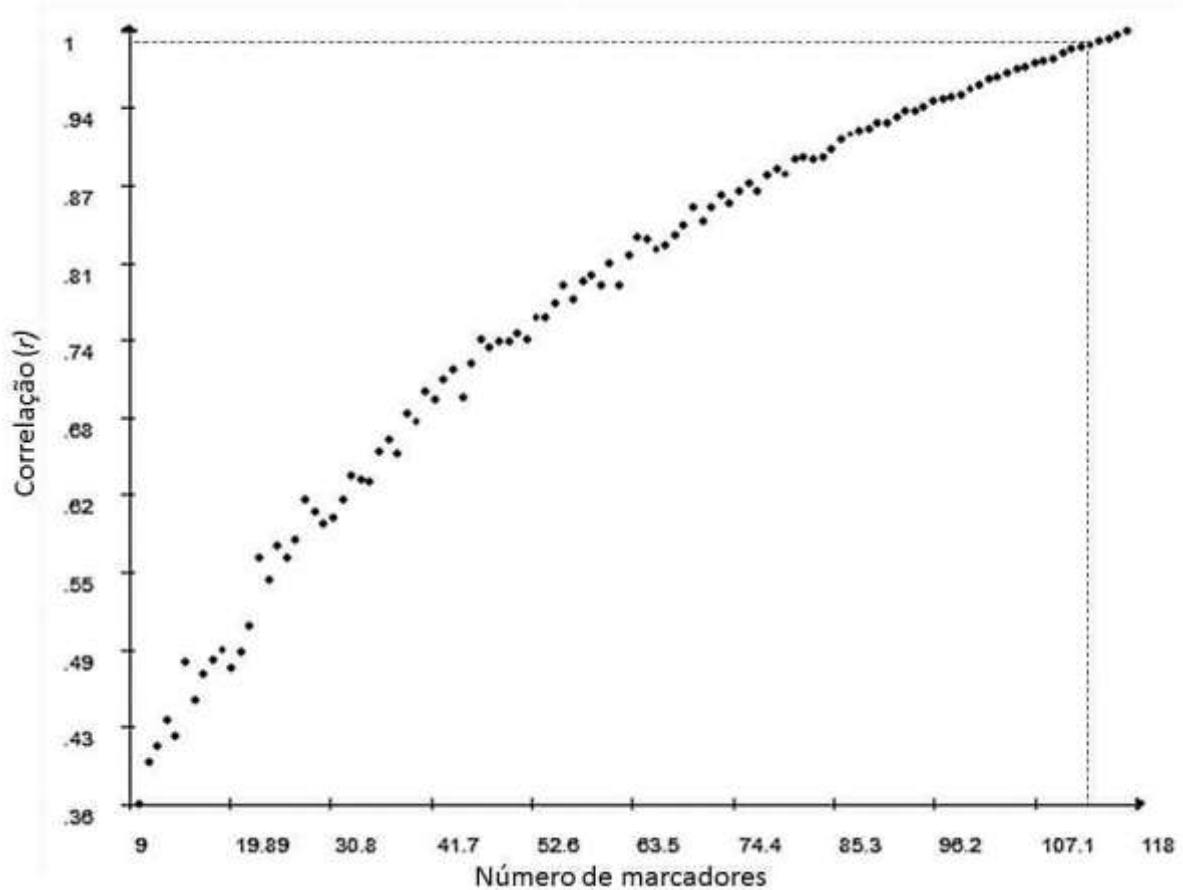
<i>Primer</i>	PM (máx-min)	NTB	NBP	PBP(%)	PIC
UBC 807	1660-350	14	9	64,29	0,35
UBC 809	2080-400	21	15	71,43	0,40
UBC 810	1800-300	15	9	60,00	0,34
UBC 811	2080-550	14	3	21,43	0,29
UBC 812	1800-450	15	9	60,00	0,40
UBC 813	2080-550	16	14	87,50	0,34
UBC 836	2080-350	18	11	61,11	0,34
UBC 840	1800-250	16	9	56,25	0,36
UBC 842	1750-480	18	14	77,78	0,38
UBC 855	2080-420	18	15	83,33	0,40
UBC 868	2000-600	18	9	50,00	0,34
TOTAL	-	183	117	63,93	0,36

Figura 3.2. Perfil eletroforético demonstrado em gel de agarose a 2% produzidos pelo *primer* UBC 809 em indivíduos (31 - 59) de *M. brauna*. M – Marcador de peso molecular (Ladder 100pb).



O número ótimo de locos, para a caracterização confiável da diversidade genética dentro da população de *M. brauna*, foi de 113 locos polimórficos. A correlação (r) encontrada para o valor ótimo de locos foi de 0,99 e o valor de estresse (E) de 0,0171 (Figura 3.3).

Figura 3.3. Estimativas das correlações entre as similaridades genéticas obtidas pela análise de bootstrap e o número ótimo de fragmentos polimórficos obtidos para a população de *M. brauna*.



3.2. Estrutura e diversidade Genética

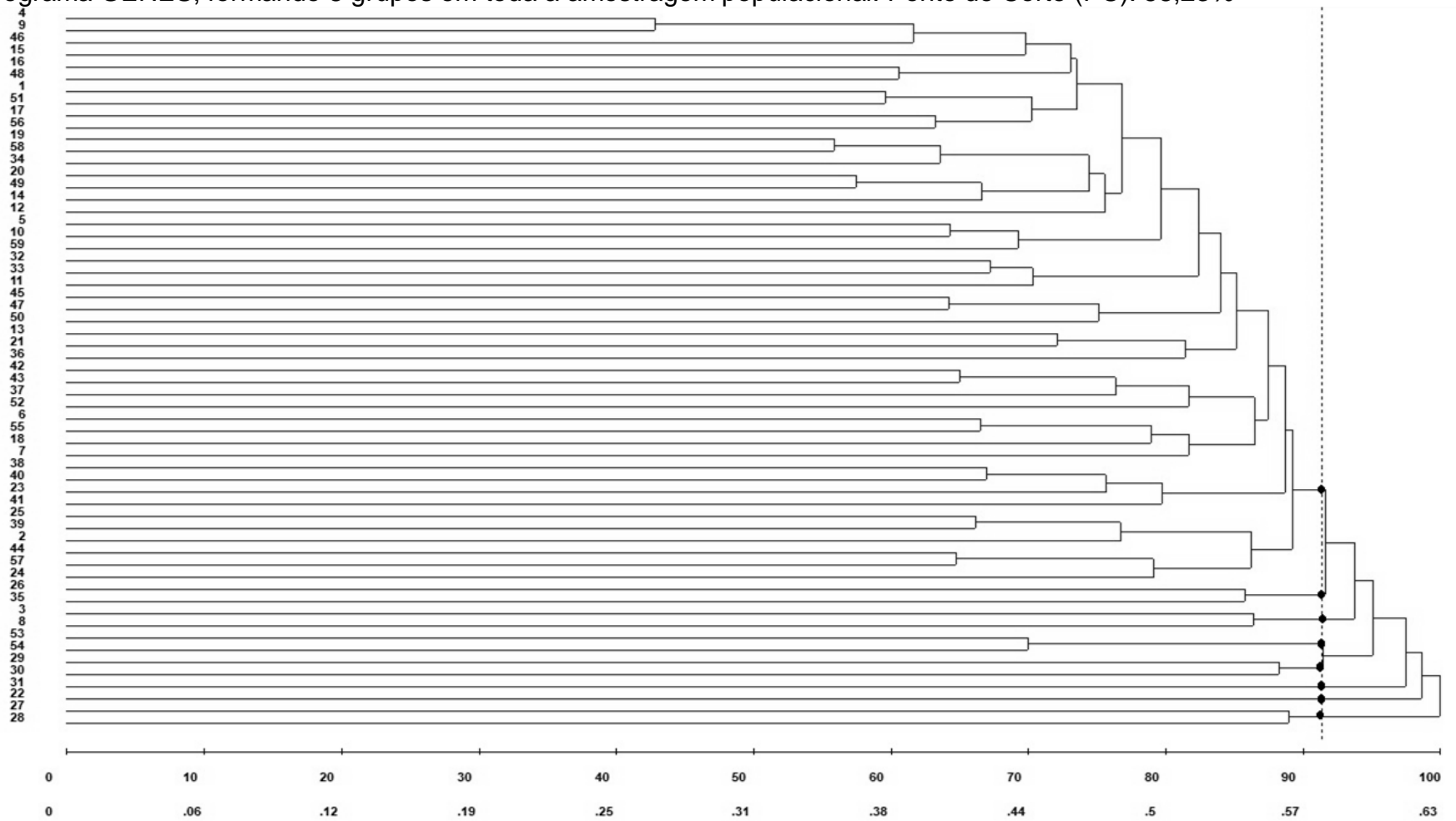
A dissimilaridade obtida por meio do complemento do coeficiente de Jaccard para os 59 indivíduos, variou de 0,273 para o par de indivíduos com menor distância genética (4 x 9) a 0,775 para o par de indivíduos com maior distância genética (22 x 29), e média de 0,52.

A representação gráfica das distâncias genéticas foi obtida pelo método UPGMA revelando oito grupos (Figura 3.4), considerando o ponto de corte de 58,23%. Os indivíduos com maior distância pertencem a agrupamentos diferentes.

O coeficiente de correlação cofenética (ccc) foi de 65,56 %, que possibilita a verificação da consistência do agrupamento. Assim, analisando-se o dendrograma é

possível distinguir um grupo com a maioria dos indivíduos (47 genótipos), cinco grupos com dois genótipos e dois grupos com um genótipo cada.

Figura 3.4. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 59 indivíduos de *M. brauna*, obtido pelo método UPGMA no programa GENES, formando 8 grupos em toda a amostragem populacional. Ponte de Corte (PC): 58,23%



As estimativas da diversidade genética baseadas nos índices de diversidade de Shannon (I) e de Nei (H) foram de 0,545 e 0,366 respectivamente.

A abordagem bayesiana utilizada pelo programa STRUCTURE avaliou a estruturação genética da população. De acordo com a Figura 3.5 o maior valor de $\text{LnP}(k)$ e o menor desvio padrão foi para $K=1$, portanto, o melhor K encontrado foi representado por um único grupo.

Figura 3.5 - Gráfico da média \pm o desvio padrão de $\text{LnP}(K)$ para 20 corridas.

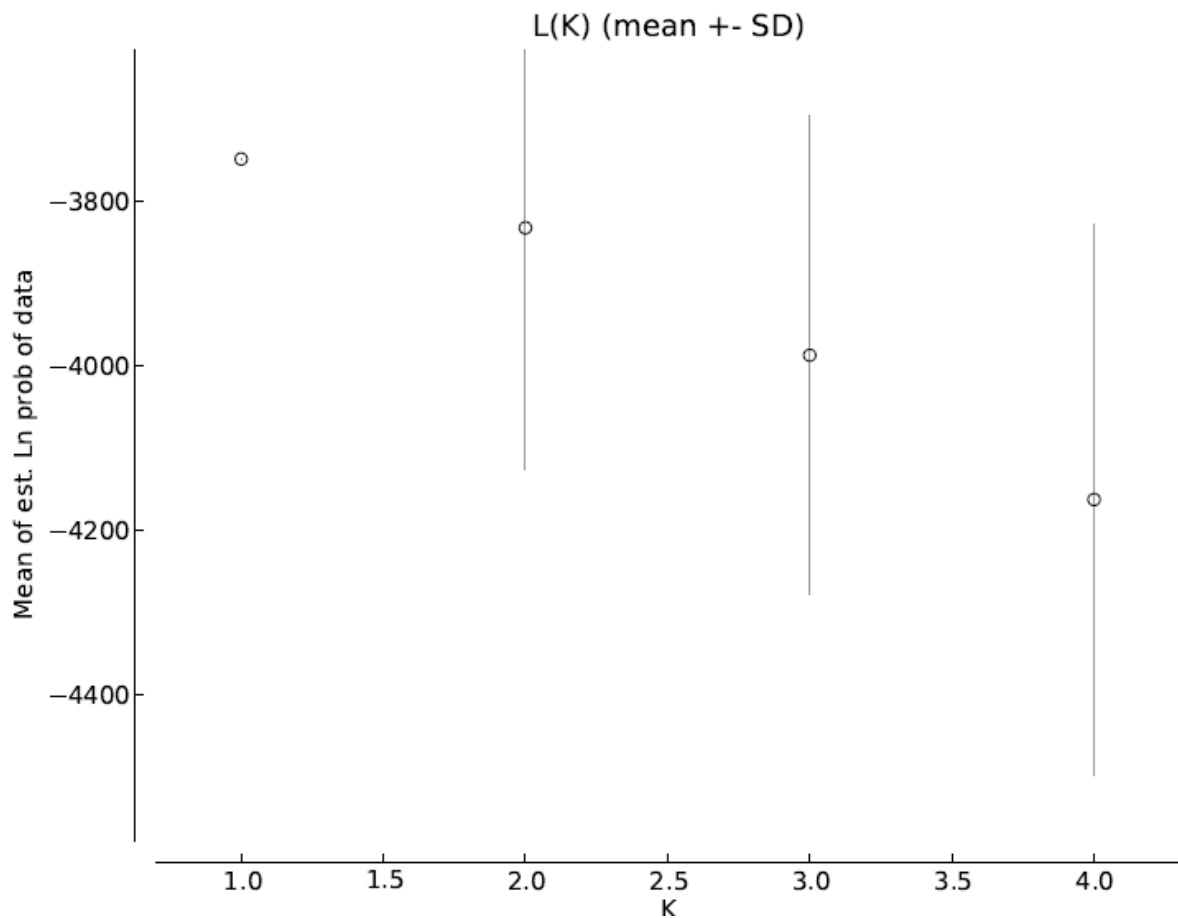
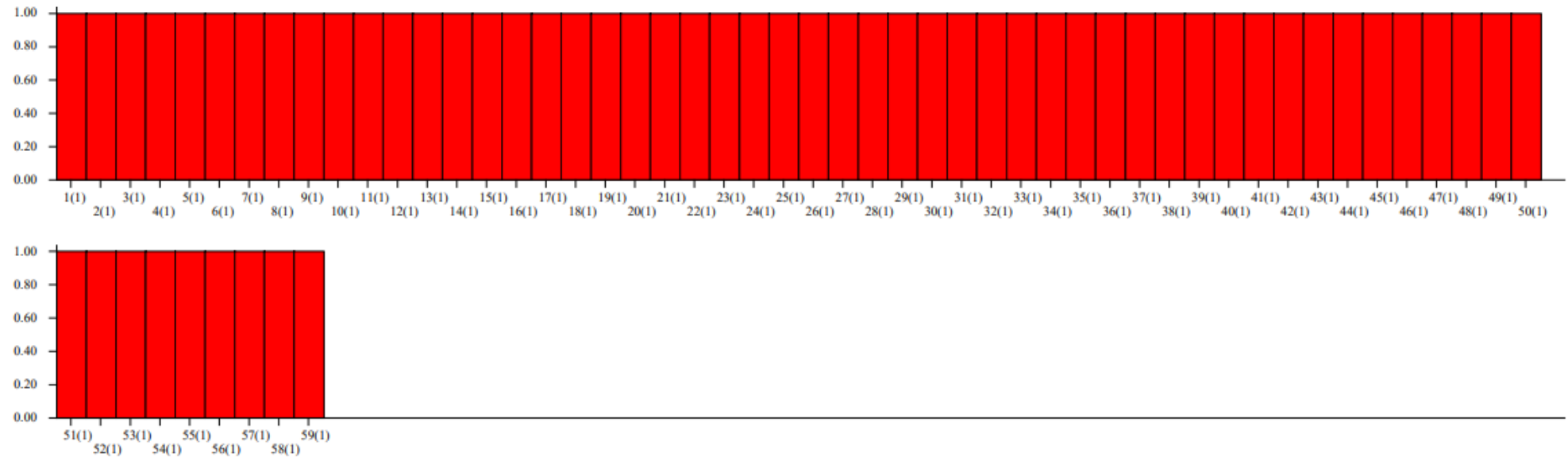


Figura 3.6. Gráfico de barras obtido pela abordagem bayesiana por meio do software STRUCTURE onde está evidenciado a formação de um único grupo genético identificados pela análise do LnP(K). Os números na horizontal correspondem aos 59 indivíduos de *M. brauna* estudados.



4. DISCUSSÃO

O Marcador molecular ISSR considera a porcentagem de locos polimórficos como medida de diversidade genética. A porcentagem de polimorfismo (63,93 %) detectada para a população (minicepas) do minijardim clonal de *M. brauna* indica que há diversidade genética a ser averiguada. Outras pesquisas corroboram com o número de iniciadores e a porcentagem de polimorfismo encontrado no presente estudo. Em trabalhos com *Erythrina velutina* Willd. foram selecionados 11 *primers*, os quais geraram 149 bandas, sendo 117 polimórficas (GONÇALVES et al., 2014). Silva Júnior et al. (2017) em estudos com *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* selecionaram 11 *primers* ISSR, obtendo-se 136 fragmentos, sendo 79 polimórficos. Contudo, o número de locos polimórficos gerados para os 11 *primers* utilizados no presente estudo se compara aos resultados obtidos para as espécies citadas anteriormente. Da mesma forma, os marcadores moleculares ISSR utilizados nesse estudo mostraram eficiência em detectar polimorfismo em minicepas do minijardim clonal de *M. brauna*.

No entanto, a eficiência na detecção de variabilidade genética pelos marcadores moleculares ISSR, entre as minicepas, pode ser avaliada com base nos valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC). Segundo a classificação sugerida por Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC acima de 0,50 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,50 são considerados moderadamente informativos e valores menores que 0,25 são considerados pouco informativos. No presente estudo os 11 *primers* utilizados apresentaram PIC no intervalo de 0,25 a 0,50 sendo classificados como moderadamente informativos, podendo ser recomendados em estudos de diversidade genética em indivíduos de *M. brauna*.

Em estudos de diversidade genética o número de fragmentos amplificados e o polimorfismo variam entre as espécies florestais. Contudo, a determinação do número ótimo de locos para a caracterização confiável da diversidade genética para a espécie em estudo contribui para a otimização de recursos e tempo, indicando o número mínimo de locos que devem ser utilizados em análises de diversidade genética (GONÇALVES et al., 2014). Assim, o número de locos encontrados nesse estudo (117) foi superior ao estabelecido como número ótimo de locos (113), indicando que as estimativas de diversidade genética obtidas entre as minicepas do minijardim clonal de *M. brauna* foram precisas.

O nível de semelhança genética entre os pares de indivíduos de uma espécie podem ser verificados por meio dos valores de dissimilaridade, o que revela dados importantes da estrutura genética da população (CRUZ, 2011). A representação gráfica dos agrupamentos gerada pelo método UPGMA, revelou a formação de oito grupos distintos, revelando ampla variabilidade genética entre os indivíduos, indicando que as minicepas de *M. brauna*, não são idênticas, geneticamente, e podem ser utilizadas como fonte de propágulos. Observou-se ainda, a formação de grupos isolados por um único genótipo, o que indica que os mesmos são mais divergentes em relação aos demais (VIEIRA et al., 2008; LIMA et al., 2015). Isso foi claramente observado para os indivíduos 22 e 31 que formaram grupos isolados.

Segundo Lewontin (1972) os valores do índice de Shannon podem variar de 0 a 1, sendo que, quanto mais próximo de 1 mais diversificada genotipicamente é a população. Os resultados gerados nesse trabalho estão de acordo com a literatura quanto aos índices de diversidade de Shannon (I) e de Nei (H), observando-se alta diversidade na espécie, quando comparado a outros trabalhos, a exemplo de *Plathymentia reticulata Benth.* (Fabaceae) com $I = 0,594$ e $H' = 0,407$ (SOUZA et al., 2017) e *Schizolobium amazonicum* (Fabaceae) com $I = 0,554$ e $H' = 0,375$ (SILVA JUNIOR et al., 2017). Demonstrando a eficiência dos marcadores ISSR na análise de diversidade genética de espécies pouco estudadas.

Avaliando sob a hipótese de coletas de propágulos para a produção de mudas para fins de recuperação de áreas degradadas ou restauração florestal, as minicepas do minijardim clonal avaliadas no presente estudo revelam potencial para este fim, pois, conserva uma satisfatória diversidade genética, fundamentada pelos valores do Índice de Shannon e Nei e pela formação de vários grupos pelo método UPGMA. Assim, as informações na matriz de dissimilaridade podem ser indicadoras para a escolha dos indivíduos mais diversificados para esse fim.

Os dados obtidos pela análise bayesiana no programa STRUCTURE, permitiram verificar como a população do minijardim clonal de *M. brauna* está estruturada. De acordo com o gráfico de barras do STRUCTURE observamos a formação de um único grupo, estes resultados corroboram com o gráfico das médias \pm o desvio padrão de $\ln P(K)$, onde observou-se o menor desvio padrão para $K=1$, o que representa a formação de apenas grupo. Com base nas análises é possível inferir que a localidade de onde foram coletadas as sementes para a formação do minijardim clonal pode ser de fato reconhecida como uma única população.

As análises possibilitaram caracterizar a diversidade e a estrutura genética do minijardim clonal, evidenciando um único grupo populacional com potencial para serem utilizadas como matrizes para coleta de propágulos vegetativos, pois conservam uma satisfatória diversidade genética fundamentada nos valores de diversidade de Nei, índice de Shannon e pela formação de grupos distintos pelo método UPGMA.

A partir dos resultados adquiridos neste estudo, torna-se importante salientar que a caracterização genética foi realizada em um minijardim clonal formado por sementes adquiridas via comercialização realizada por empresa registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), havendo apenas a informação do local de procedência das sementes (Linhares – ES). Desta forma, a diversidade genética caracterizada como alta, pode estar relacionada à coleta de sementes em muitas árvores matrizes.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a porcentagem de polimorfismo revelada pelo marcador ISSR em *M. brauna* e os valores do PIC, apontaram que os *primers* utilizados foram adequados para as análises de diversidade.

O minijardim clonal da espécie *M. brauna* avaliada no presente estudo, apresenta alta diversidade genética;

O estudo permitiu avaliar que a população formada no minijardim clonal pode ser utilizada como fonte de propágulo para a produção de mudas por miniestaquia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *M. brauna* apresenta potencial para reflorestamentos e arborização urbana, entretanto, ainda existem poucos estudos dedicados ao aprimoramento da técnica de propagação vegetativa por miniestaquia e conservação dessa espécie.

Observamos que é possível a propagação vegetativa da *M. brauna* por miniestaquia, usando miniestacas caulinar apical de matrizes juvenis. Porém, devem ser realizados estudos que avaliem a quebra da dominância apical das minicepas, com o intuito de aumentar a produtividade do minijardim clonal. E estudos que potencializem o processo de enraizamento, testando-se concentrações maiores do regulador de crescimento e formas de aplicação do mesmo.

7. REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M. M. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. In: MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 99-106.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, v. 32, p. 314–331. 1980. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686077/>>. Acesso em: 12 jan. 2019
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n.º 443, de 14 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2014. Seção 01, p. 121. Disponível em: <<http://sintse.tse.jus.br/documentos/2014/Dez/18/portaria-no-443-de-17-de-dezembro-de-2014>>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- CARVALHO, F. A.; NASCIMENTO, M. T.; BRAGA, J. M. A. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo de um remanescente de Mata Atlântica submontana no município de Rio Bonito, RJ, Brasil (Mata Rio Vermelho). **Revista Árvore**, v.31, p.717-730, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-67622007000400017&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em 20 jan. 2018
- COSTA, C. **Uma floresta de oportunidades**: um novo olhar sobre a Mata Atlântica do Nordeste. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2012. 56 p. Disponível em: <<https://www.conservation.org/global/brasil/publicacoes/Documents/umaflorestadeoportunidades.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2018.
- CRUZ, C. D. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, p. 271-276, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>>. Acesso em: 06 jan. 2019.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. 1a ed. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema, 2011. 620 p
- DIAS, P. C. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- FERRIANI, A. P. et al. Produção de brotações e enraizamento de miniestacas de *Piptocarpha angustifolia*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 31, n. 67, p. 257-264, 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/43559/1/Producao-de-brotacoes-e-enraizamento-de-miniestacas-de-Piptocarpha-angustifolia.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

GONÇALVES, L. O. et al. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 290-298, 2014.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, v. 37, p. 547-579, 1901. Disponível em: <<https://doi.org/10.5169/seals-266450>>. Acesso em: 06 dez. 2018.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, v. 6, p. 381-398, 1972. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-9063-3_14>. Acesso em: 07 dez. 2018.

LIMA, E. N. et al. Diversidade genética de clones de aceroleira avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 6, n. 2, p. 174-180, 2015. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6294665>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

MOJEMA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/comjnl/20.4.359>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Pittsburgh, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/89/3/583>>. Acesso em: 06 jan. 2019.

NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. **ASM Science Journal**, v. 9, p. 30-39, 2015.

OLIVEIRA, T. P. F. et al. Aplicação de AIB e tipo de miniestacas na produção de mudas de *Handroanthus heptaphyllus* Mattos. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 313-320, 2016. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/21128>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

PINTO, L. P. et al. Mata Atlântica brasileira: Os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. In: ROCHA, C. F. D. et al. (Org.). **Biologia da conservação: Essências**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 69-96.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1461096/>>. Acesso em: 06 jan. 2019.

ROLDAN-RUIZ, I. et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, v. 6, n. 2, p. 125-134, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>>. Acesso em: 06 jan. 2019.

SHANNON, C.E.; WIEVER, W. A. **Mathematical model of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949.

SILVA JUNIOR, A. L. et al. Genetic diversity of *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex. Ducke) Barneby, in a forest area in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 3, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://nupemase.com/_files/200001540-e7b19e8b3e/artigoschizolobium-parahyba%20GMR%20Ms%20%20Adelson.pdf>. Acesso em: 06 mar 2018.

SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS – INPE. **Atlas dos remanescentes da Mata Atlântica - período 2015-2016**. São Paulo: SOS Mata Atlântica; Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2017. 69p. Disponível em: <http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/atlas_2015-2016_relatorio_tecnico_2017.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2018.

SOUZA, L.C.; et al. Genetic diversity of *Plathymenia reticulata* Benth. in fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, 2017.

VIEIRA, E. A. et al. Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do Cerrado acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.1, p.56-67, 2008. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/572262/1/bolpd179.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, Meise, v. 129, p.156-157, 1997.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain-reaction amplification. **Genomics**, New York, v. 20, p. 176-183, 1994.