



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

ALINE RAMALHO DOS SANTOS

**PROPAGAÇÃO SEXUADA, VEGETATIVA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Dalbergia nigra EM MINIJARDIM CLONAL**

JERÔNIMO MONTEIRO – ES

2019

ALINE RAMALHO DOS SANTOS

**PROPAGAÇÃO SEXUADA, VEGETATIVA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Dalbergia nigra EM MINIJARDIM CLONAL**

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.

Orientadora: Elzimar de Oliveira Gonçalves
Coorientador: Fábio Demolinari de Miranda

JERÔNIMO MONTEIRO - ES

2019

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

D722p dos Santos, Aline Ramalho, 1993-
Propagação sexuada, vegetativa e diversidade genética de *Dalbergia nigra* em minijardim clonal / Aline Ramalho dos Santos. - 2019.
136 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. Nutrição das plantas. 2. Propagação de plantas. 3. Marcadores genéticos. 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
Dalbergia nigra EM MINIJARDIM CLONAL**

Aline Ramalho dos Santos

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.

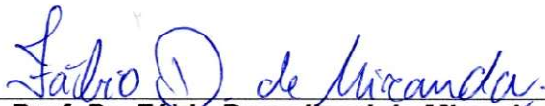
Aprovada em 26 de fevereiro de 2019.



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

Dedico a Deus e aos meus pais,
por serem meus alicerces, meus
heróis, meu tudo. A vocês, meu
eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o autor da vida, meu guia, pelo seu amor infinito, sem Ele nada sou.

Aos meus pais, porque a eles devo tudo e sem sua ajuda não teria chegado tão longe. Tudo o que conquistei representa o seu empenho, o seu suor, a sua força de nunca desistir. Meus heróis! Amo vocês sem limites!

Aos meus irmãos, com quem tive a certeza que nunca estaria só.

Aos meus tios Fabrícia, Jaime e Roberta pelo incentivo, pela força e principalmente pelo carinho.

A toda minha família pelo exemplo de perseverança, educação e humildade que me ensinaram a ter caráter, honestidade e retidão.

A minha orientadora Elzimar, pela paciência e confiança, pelas oportunidades oferecidas e pela contribuição em minha vida acadêmica, profissional e pessoal. E ao meu co-orientador Fábio, por ter me recebido de braços abertos e por estar sempre de prontidão para ajudar. Como diz o grande Isaac Newton “Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”.

A Elbya, irmã de coração, pelo companheirismo, amizade, por todas as ajudas, pelos longos dias de viveiro e pelos muitos momentos de alegria compartilhados, colaborando enormemente para a conclusão deste trabalho.

Ao Adelson, pela amizade, paciência, carinho, sacrifícios e ajudas. Quero que saiba que sua ajuda foi de grande valia.

A Eduarda, que embora distante sempre foi um ponto de apoio.

Ao Otávio, pela amizade, risadas, conversas, confiança e por não ser somente uma super mão que ajuda, mas um exemplo de pessoa e profissional.

Aos amigos, com quem eu dividi tristezas, momentos de ansiedade, nervosismo, medo, aventuras, alegrias e os meus melhores momentos nesses dois anos e que se tornaram minha família em Jerônimo. Muito obrigado Paty, Elbya, Rodrigo, Lhoraynne, Daiana, Caio, Nayara, Maricélia, Dudu e Emanuel.

Aos amigos do NUPEMASE, Elias, Davi, Guilherme, Juliana, Naiara, João Paulo, Raniéri, Julia, Valéria, Paulo, Roberto e Raquel, pelas risadas e “conversas jogadas fora” e não poderia esquecer, pelos infinitos cafés compartilhados.

Aos bolsistas de IC por todos os momentos que compartilhamos e pela imprescindível ajuda na coleta de dados.

Aos vigilantes do Viveiro, Josuel e Valle, pela companhia das noites, ajuda e gentilezas. Ao Juninho pelas conversas e risadas.

Ao meu amigo Bidu, pela disposição em pintar 600 vasos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, que sempre estiveram dispostos a ajudar e pelo carinho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite de participação, pelas contribuições e ensinamentos.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio e concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), N^o Processo: 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 N^o de processo: 23068.010686/2012-18.

E finalmente, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação. Essa é uma conquista coletiva, sozinha eu não teria chegado até aqui. Muito obrigado!

*“Se vai tentar, vá até o fim.
Caso contrário, nem comece.”
(Charles Bukowski)*

RESUMO GERAL

SANTOS, Aline Ramalho dos. **Propagação sexuada, vegetativa e diversidade genética de *Dalbergia nigra* em minijardim clonal**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Coorientador: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda.

A demanda por mudas para estabelecimento de plantios florestais, seja para fins comerciais ou restauração tem crescido rapidamente, paralelamente, ocorre à busca no aprimoramento de técnicas de produção de mudas de baixo custo e de bom desempenho no campo. Desta forma, objetivou-se com este trabalho, avaliar a propagação sexuada, vegetativa e diversidade genética de *Dalbergia nigra* em minijardim clonal. A dissertação foi estruturada em três capítulos. No capítulo I, objetivou-se analisar o crescimento de mudas de duas procedências de *D. nigra* cultivadas em substrato acrescidos de diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (FLC). Os resultados indicaram que a altura das mudas aos 120 dias, massa seca da raiz, da parte aérea e total foram influenciados significativamente pela interação ($p \leq 0,05$) entre os fatores doses de FLC e procedências de *D. nigra*. O maior crescimento das mudas foi observado para a procedência Linhares na dose $7,46 \text{ kg m}^{-3}$ de FLC. Já a dose $5,99 \text{ kg m}^{-3}$ é a mais adequada à produção de mudas da procedência Viçosa. O capítulo II aborda o potencial da estaquia e miniestaquia como método de propagação vegetativa para a *D. nigra*. O minijardim clonal de *D. nigra* obteve 100% de sobrevivência após 13 coletas sucessivas. A utilização de ácido indol-3-butírico (AIB) em miniestacas de *D. nigra* não é um condicionante para o enraizamento, embora a adição de 6.000 mg Kg^{-1} AIB promoveram maior comprimento e número de raízes, vigor de miniestacas e massa seca da raiz de miniestacas apicais. Para miniestacas intermediárias a adição de 6.000 mg Kg^{-1} de AIB antecipou o tempo médio de emissão das raízes e proporcionou maior número de raízes adventícias. Entretanto, as concentrações de AIB reduziram linearmente a emissão de brotos, massa seca da parte aérea e massa seca total. O teor nutricional da planta matriz influenciou no enraizamento de miniestacas, sendo a procedência de Linhares mais responsiva a adição de FLC. As procedências geográficas apresentaram um conjunto de respostas e comportamento diferencial no enraizamento. As estacas de material

adulto apresentaram elevada mortalidade e ausência de enraizamento. A miniestaquia, utilizando material juvenil, mostrou-se tecnicamente viável como forma de propagação de *D. nigra*, sendo possível usar esta metodologia para produção de mudas em larga escala. No capítulo III, objetivou-se caracterizar a diversidade genética em minijardim clonal de *D. nigra*. Os marcadores ISSR utilizados para *D. nigra* foram eficientes na detecção de polimorfismo. A população apresentou consistente estruturação e alta diversidade genética. A maior riqueza foi encontrada nas minicepas de Linhares. As populações de *D. nigra* apresentam moderada diferenciação genética, sendo verificada que a maior proporção da diversidade genética está dentro das populações. As minicepas apresentam elevada diversidade e, portanto, revela potencial para serem utilizados como matrizes para coleta de propágulos na produção de mudas para fins conservacionistas.

Palavras-chave: nutrição florestal, espécie nativa, extinção, clonagem, conservação genética.

GENERAL ABSTRACT

SANTOS, Aline Ramalho dos. **Sexed propagation, vegetative and genetic diversity of *Dalbergia nigra* in miniclonal garden**. 2019. Dissertation (Master of Forest Science) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Prof^a. Dr^a. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Co-adviser: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda.

The demand for seedlings for establishment of forest plantations, whether for commercial or restoration purposes has grown rapidly, in parallel, there is the search for improvement of production techniques for low-cost seedlings and good performance in the field. Thus, the aim of this work was to evaluate the sexed propagation, vegetative and genetic diversity of *Dalbergia nigra* in miniclonal garden. The dissertation was structured in three chapters. In Chapter I, the objective of this study was to analyze the seedling growth of two *D. nigra* provenances grown on substrate plus different doses of controlled release fertilizer (FLC). The results indicated that the height of the seedlings at 120 days, dry mass of the root, shoot and total were significantly influenced by the interaction ($p \leq 0.05$) between the FLC dose factors and *D. nigra* origins. The highest growth of the seedlings was observed for the Linhares origin in the dose 7.46 kg m^{-3} of FLC. The dose 5.99 kg m^{-3} is the most adequate for the production of seedlings from Viçosa. Chapter II discusses the potential of cutting and minicutting technique as a vegetative propagation method for *D. nigra*. The miniclonal garden of *D. nigra* obtained 100% survival after 13 successive collections. The use of indole-3-butyric acid (IBA) in minicuttings of *D. nigra* is not a conditioning factor for rooting, although the addition of $6,000 \text{ mg Kg}^{-1}$ IBA promoted a greater length and number of roots, minicut vigor and dry mass of the root of apical minicuttings. For intermediate minicuttings the addition of $6,000 \text{ mg Kg}^{-1}$ of IBA anticipated the mean time of root emission and provided a higher number of adventitious roots. However, IBA concentrations linearly reduced shoot emission, shoot dry matter and total dry mass. The nutritional content of the matrix plant influenced in the rooting of minicuttings, being the origin of lineages more responsive to the addition of FLC. The geographical origins presented a set of responses and differential behavior in rooting. The cuttings adult showed high mortality and no rooting. The minicutting technique, using juvenile material, proved to be technically viable as a way of propagating *D. nigra*, and it is possible to use this methodology to produce large

scale seedlings. In chapter III, the objective was to characterize the genetic diversity in moniclonal garden of *D. nigra*. The ISSRs used for *D. nigra* were efficient in detecting polymorphism. The population showed consistent structure and high genetic diversity. The greatest wealth is found in the ministumps of the Linhares. The populations of *D. nigra* present moderate genetic differentiation, being verified that the greater proportion of the genetic diversity is within the populations. The ministumps present high diversity and, therefore, it reveals the potential to be used as matrices for the collection of propagules in the production of seedlings for conservation purposes.

Keywords: forest nutrition, native species, extinction, cloning, genetic conservation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Informações climáticas de Viçosa, MG e Linhares, ES.....	47
Tabela 1.2 - Caracterização químico-física do fertilizante de liberação controlada.....	47
Tabela 1.3 - Análise de variância e teste médias das variáveis de crescimento de duas procedências de <i>D. nigra</i> submetidas a diferentes doses de fertilizantes de liberação controlada.....	50
Tabela 2.1 - Desdobramento da interação entre os fatores doses de fertilizante de liberação controlada (FLC) e procedências geográficas para a produtividade de minicepas (PM) por m ² , de <i>D. nigra</i>	75
Tabela 2.2 - Médias da produtividade de minicepas de <i>D. nigra</i> por m ² , em função dos meses de coletas.....	75
Tabela 2.3 - Análise de variância para as variáveis de crescimento do sistema radicular de miniestacas apicais de duas procedências geográficas de <i>D. nigra</i> submetidas a diferentes doses de fertilizantes de liberação controlada e concentrações de ácido indol-3-butírico, aos 60 dias após estaqueamento.....	76
Tabela 2.4 - Desdobramento da interação entre doses de fertilizante de liberação controlada e procedências geográficas para a massa seca da raiz (MSR) de miniestacas de <i>D. nigra</i>	78
Tabela 2.5 - Análise de variância para as variáveis de crescimento do sistema radicular de miniestacas intermediárias de duas procedências geográficas de <i>D. nigra</i> submetidas a diferentes doses de fertilizantes de liberação controlada e concentrações de ácido indol-3-butírico, aos 60 dias após estaqueamento.....	79
Tabela 2.6 - Médias do tempo médio de emissão das raízes (TMER) e do comprimento de raízes (CR) de miniestacas de <i>D. nigra</i> , sob diferentes doses de fertilizante de liberação controlada, aos 60 dias estaqueamento.....	80
Tabela 2.7 - Tempo médio de emissão das raízes (TMER), comprimento de raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) de miniestacas de <i>D. nigra</i> de diferentes procedências geográficas, aos 60 dias após estaqueamento.....	80
Tabela 2.8 - Desdobramento da interação entre os fatores doses de fertilizante de liberação controlada e procedências geográficas para o vigor (VIG) de miniestacas de <i>D. nigra</i> , aos 60 dias após estaqueamento.....	80
Tabela 3.1 - Informações climáticas de Viçosa, MG e Linhares, ES.....	106

Tabela 3.2 - *Primers* ISSR produzidos pela *University of British Columbia* (UBC) e suas respectivas sequências (5'-3') testados em amostras de DNA de quatro indivíduos da espécie *D. nigra*.....108

Tabela 3.3 - *Primers* ISSR selecionados para *D. nigra*, incluindo a faixa de variação de tamanho dos locos em pares de bases (TPB), número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por primer e conteúdo da informação de polimorfismo (PIC).....114

Tabela 3.4 - Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) de procedências de *D. nigra*.....122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Características dendrológicas da espécie <i>Dalbergia nigra</i>	20
Figura 2.1 - (a) Altura aos 60 dias; (b) diâmetro do coleto aos 60 dias; (c) Altura aos 90 dias; (d) diâmetro do coleto aos 90 dias; (e) Altura aos 120 dias; (f) diâmetro do coleto aos 120 dias de plântulas de <i>D. nigra</i> em função de doses de fertilizante controlada, Jerônimo Monteiro, Brasil, 2019.....	51
Figura 2.2 - (a) número de folhas aos 60 dias; (b) número de folhas aos 90 dias; (c) número de folhas 120 dias; (d) clorofila foliar total aos 120 dias de plântulas de <i>D. nigra</i> em função de doses de fertilizante controlada, Jerônimo Monteiro, Brasil, 2019.....	53
Figura 2.3 - (a) comprimento do sistema radicular; (b) massa seca da raiz; (c) massa seca da parte aérea; (d) massa seca total; (e) índice de qualidade de Dickson de mudas de <i>Dalbergia nigra</i> em função de doses de fertilizante controlada, Jerônimo Monteiro, Brasil, 2019.....	54
Figura 3.1 - (a) porcentagem de enraizamento; (b) comprimento da maior raiz; (c) número de raízes por miniestaca; (d) vigor de miniestacas de <i>D. nigra</i> submetidos a diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico, aos 60 dias após estaqueamento. * e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.....	77
Figura 3.2 - Massa seca da raiz (MSR) de miniestacas de <i>D. nigra</i> submetidos a diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico no enraizamento, aos 60 dias após estaqueamento. * significativo a 5% de probabilidade.....	78
Figura 3.3 - (a) tempo médio de emissão das raízes (b) número de raízes por miniestacas; (c) brotações; (d) brotações; (e) massa seca da parte aérea; (f) massa seca total de miniestacas de <i>D. nigra</i> 60 dias após estaqueamento. * e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.....	82
Figura 4.1 - Minijardim clonal de <i>D. nigra</i> conduzido em vasos. Jerônimo Monteiro, Brasil, 2019.....	105
Figura 4.2 - Etapas metodológicas necessárias para a caracterização da diversidade genética em minijardim clonal de <i>D. nigra</i>	113
Figura 4.3 - Padrão de bandas demonstrado em gel de agarose 2% produzido pelo primer UBC 840 em indivíduos (31- 60) de <i>D. nigra</i> . M – Marcador de peso molecular (<i>Ladder</i> 100pb).....	116
Figura 4.4 - Coeficiente de correlação (r) obtido pela análise de bootstrap e o número ótimo de fragmentos polimórficos obtidos para a população de <i>D. nigra</i>	117

Figura 4.5 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 39 indivíduos de <i>D. nigra</i> da procedência de Viçosa, Minas Gerais, obtido pelo método UPGMA.....	119
Figura 4.6 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 52 indivíduos de <i>D.nigra</i> da procedência de Linhares, Espírito Santo, obtido pelo método UPGMA.....	120
Figura 4.7 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 90 indivíduos de <i>D.nigra</i> , obtido pelo método UPGMA.....	121
Figura 4.8 - Gráfico dos valores de ΔK , segundo correção de Evanno, Regnaut e Goudet (2005), mostrando o maior valor de ΔK para $K= 2$	122
Figura 4.9 - Gráfico de barras obtido pela abordagem bayesiana por meio do software STRUCTURE onde são amostrados os dois grupos identificados pela análise ($K= 2$). Os números na horizontal correspondem aos 90 indivíduos de <i>D. nigra</i> estudados. Os números entre parênteses representam as procedências das sementes que originaram as matrizes no minijardim clonal, 1 – Viçosa, Minas Gerais e 2 – Linhares, Espírito Santo.....	123

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1 <i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Allemão ex Benth.	20
1.2 Propagação vegetativa de espécies florestais.	22
1.3 Fatores que interferem na propagação vegetativa.....	24
1.3.1 Nutrição mineral da planta matriz	25
1.3.2 Uso de fitorreguladores	27
1.3.3 Posição do propágulo	29
1.4 Aspectos genéticos na produção de mudas de espécies florestais nativas....	30
1.5 Marcadores moleculares ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>)	32
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO I – PROCEDÊNCIAS E FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dalbergia nigra</i>	42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
3. RESULTADOS	50
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO II – PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE <i>Dalbergia nigra</i> POR ESTAQUIA E MINIESTAQUIA	61
RESUMO	62
ABSTRACT	64
1. INTRODUÇÃO	66
2. OBJETIVOS	68
2.1 Objetivo Geral	68
2.2 Objetivos Específicos.....	68
3. MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1 Obtenção das matrizes	69
3.2 Estabelecimento e manejo do minijardim clonal	69
3.3 Experimento I - Obtenção e enraizamento das miniestacas de material juvenil.	69
3.4 Experimento II - Obtenção e enraizamento das estacas de material adulto ..	71
3.5 Avaliações experimentais	71
3.5.1 Sobrevivência e produção das minicepas	72
3.5.2 Efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas	72
4. RESULTADOS	75
4.1 Sobrevivência e produtividade de minicepas (PM)	75
4.2 Enraizamento de miniestacas apicais.....	76
4.3 Enraizamento de miniestacas intermediárias.....	79
5. DISCUSSÃO	84

5.1 Sobrevivência e produção das minicepas	84
5.2 Enraizamento de miniestacas apicais	85
5.3 Enraizamento de miniestacas intermediárias.....	87
5.4 Enraizamento de estacas de material adulto	89
6. CONCLUSÕES	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

CAPÍTULO III – DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Dalbergia nigra</i> EM MINIJARDIM	
CLONAL	97
RESUMO	98
ABSTRACT	100
1. INTRODUÇÃO	102
2. OBJETIVOS	104
2.1 Objetivo Geral	104
2.2 Objetivos Específicos.....	104
3. METODOLOGIA	105
3.1 Obtenção e seleção do material para caracterização genética.....	105
3.2 Extração de DNA	106
3.3 Amplificações com marcadores <i>Inter-Simple Sequence Repeat</i> – ISSR	107
3.4 Análise dos dados moleculares	109
3.5.1 Análises intrapopulacionais	110
3.5.2 Análises interpopulacional	112
4. RESULTADOS	114
4.1 Seleção dos <i>primers</i> ISSR	114
4. 2 Análises Intrapopulacionais	117
4. 3 Análises interpopulacional	121
5. DISCUSSÃO	124
5.1 Seleção dos <i>primers</i> ISSR	124
5. 2 Diversidade Intrapopulacional.....	125
5. 3 Análises interpopulacional	127
6. CONCLUSÕES	129
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica, detentora de elevada biodiversidade e alto grau de endemismo, é reconhecida como um dos 34 *hotspots* e figura entre os cinco principais biomas no ranking de biodiversidade do mundo (LAGOS; MULLER, 2007). Os hotspots são áreas que perderam pelo menos 70% de sua cobertura vegetal original, mas que abrigam mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta (FREIRE et al., 2007).

A intensa perda e fragmentação levaram à formação de um grande número de remanescentes isolados e pulverizados, muitos com dimensões insuficientes para sustentar genética e ecologicamente as populações associadas e uma porção bem maior, composta de áreas em diversos estágios de degradação (NASCIMENTO et al., 2015).

Nesse bioma, muitas espécies arbóreas nativas como a *Dalbergia nigra* (Vell.) Allem. Ex Benth, da família Fabaceae, apresentam potencial de utilização para diversos fins, como na recuperação de áreas alteradas, uso do produto madeireiro ou paisagístico. Essa espécie caracteriza-se como secundária tardia, com crescimento de moderado a rápido. A madeira é resistente a intempéries com extraordinária durabilidade e de grande valor econômico (CARVALHO, 2003). Atualmente, encontra-se ameaçada de extinção e seu comércio nacional e internacional proibido (RESENDE et al., 2011).

O sucesso inicial de qualquer projeto florestal, seja ele para fins conservacionistas ou comerciais, depende de uma série de fatores, sendo a qualidade das mudas produzidas fundamental para o sucesso inicial. Os viveiros florestais podem atingir esse resultado por meio da utilização de adequadas técnicas silviculturais empregadas no cultivo (DUTRA et al., 2016)

A propagação de espécies florestais nativas está, em sua grande maioria, relacionada à forma sexuada, devido ao maior domínio da técnica. Entretanto, esta forma de propagação apresenta limitações para a produção de mudas em escala comercial. Uma alternativa de propagação para as espécies nativas, sobretudo aquelas que apresentam dificuldade no armazenamento de sementes, no potencial germinativo, na produção irregular ou baixa de sementes, na obtenção de material vegetativo com grau de juvenildade, dificuldade de localizar matrizes de espécies raras, é a

propagação vegetativa. Esta técnica favorece a formação de um banco de matrizes, com fornecimento de material diversificado para produção de mudas, além de permitir a seleção de matrizes com características fenotípicas superiores para a produção comercial (OLIVEIRA et al., 2016).

Por outro lado, o sucesso da propagação de plantas de espécies lenhosas tem sido limitado por diminuição da capacidade de induzir raízes adventícias, (HARTMANN et al., 2011). Dentre os fatores que podem melhorar os resultados, destacam-se a aplicação de reguladores vegetais, principalmente do grupo das auxinas, que favorece o processo de enraizamento adventício em diversas espécies. Dentre as auxinas, a utilização de ácido indol-3-butírico (AIB) têm se mostrado mais eficaz na maioria dos casos (SAUER et al., 2013). Além disso, o estado nutricional da planta matriz mostra-se de grande importância na propagação vegetativa, pois influencia diretamente na produtividade, no enraizamento das estacas e na qualidade das mudas, uma vez que os macro e micronutrientes estão envolvidos nos processos bioquímicos e fisiológicos vitais da planta (ASSIS et al., 2004; HARTMANN et al., 2011).

A estaquia e miniestaquia apresenta potencial de utilização em espécies lenhosas, entretanto, são escassas as informações sobre a propagação vegetativa de jacarandá-da-bahia, sendo necessário o estudo de técnicas que permitam aumentar o percentual de enraizamento da espécie, viabilizando a produção comercial de mudas (DIAS et al., 2012). Diante disso, objetivou-se com este estudo avaliar a propagação sexuada, vegetativa e diversidade genética de *Dalbergia nigra* em minijardim clonal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwood with emphasis on Eucalyptus. In: WALTER, C.; CARSON, M. **Plantation Forest biotechnology for the 21th century**. New Delhi, India, Research Sign Post, 2004, p.303-333.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Informações Tecnológicas, 2003. 1035 p
- DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.
- 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**, v. 46, n. 4, p. 491-498, 2016.
- FREIRE, J. M.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; LIMA, E. R.; SODRÉ, S. R. C.; CORRÊA, R.C. Estrutura genética de populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) por meio de marcadores RAPD. **Scientia Florestalis**, n. 74, p. 27-35, 2007.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th. ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011. 900 p.
- LAGOS, A. R.; MULLER, B. L. A. Hotspot brasileiro: Mata Atlântica. Universidade UNIGRANRIO. **Saúde e ambiente em revista**, v. 2, n. 2, p. 35-45, 2007.
- NASCIMENTO, L. S.; CERQUEIRA, R. M.; HENDERSON, B. L. Produção de serapilheira em um fragmento adjacente a uma cava de mineração, Ribeirão Grande, SP. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 19, n. 9, p. 892-897, 2015.
- OLIVEIRA, T. P. F.; BARROSO, D. G.; LAMÔNICA, K. R.; CARVALHO, G. C. M. W. Aplicação de AIB e tipo de miniestacas na produção de mudas de *Handroanthus heptaphyllus* Mattos. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 299-306, 2016.
- RESENDE, L. C.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Diversity and genetic connectivity among populations of a threatened tree (*Dalbergia nigra*) in a recently fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetica**, v. 139, n. 9, p. 1159-1168, 2011.
- SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 2565-2577, 2013.

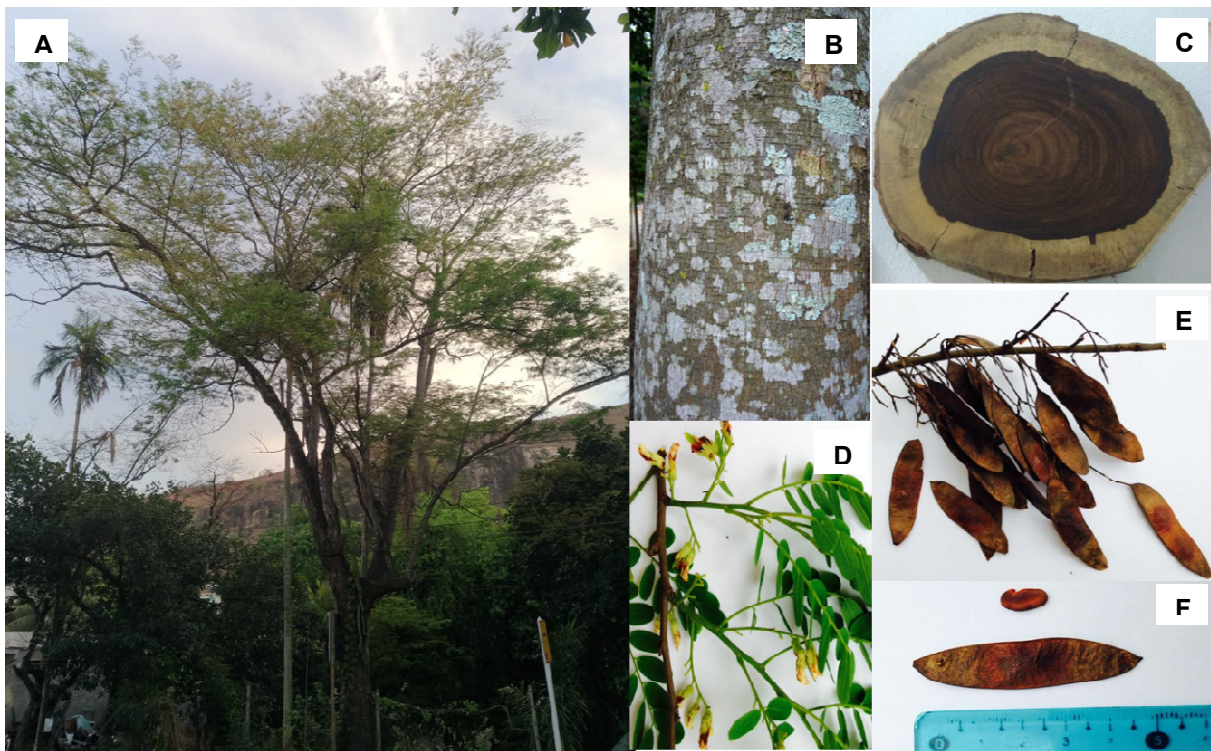
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.

Dalbergia nigra (Vell.) Allemão ex Benth., conhecida popularmente como jacarandá-da-bahia, jacarandá-caviúna ou jacarandá-preto, pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoidea. Esta espécie é endêmica do Brasil, com distribuição natural nos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, na fitofisionomia de Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica) (CARVALHO, 2003; LIMA, 2015).

As árvores dessa espécie possuem crescimento moderado a rápido, podendo atingir de 15 a 25 m de altura e diâmetro à altura do peito (DAP) de 40 a 80 centímetros e em casos excepcionais podem chegar a medir 35 m de altura e 155 cm de DAP, na idade adulta (LEÃO; VINHA, 1975; LORENZI, 2009) (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Características dendrológicas da espécie *Dalbergia nigra*.



a) Indivíduo adulto crescendo a pleno sol no município de Jerônimo Monteiro, Espírito Santo, Brasil; b) Caule da planta com cinco anos de idade em plantio; c) Disco de madeira; d) Folhas e frutos da planta em pleno sol; e) Frutos em maturação; f) Semente.

O jacarandá-da-bahia possui madeira de média a alta densidade (0,75 a 1,22

g.dm⁻³), sendo mundialmente conhecida na construção de mobiliário de luxo; acabamentos internos em construção civil, como lambris, molduras, portas, rodapés e, também, em revestimento de móveis, instrumentos musicais etc. (LORENZI, 2009).

É uma espécie que apresenta alto potencial para recuperação de solo, por depositar razoável camada de folhas e mostrar grande amplitude de tolerância ambiental (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2009). Além disso, é recomendada para o uso ornamental de praças, parques, avenidas (LORENZI, 2009; SILVA JÚNIOR, 2012), em virtude da sua inflorescência de reconhecida beleza cênica e agradável aroma, composta por flores na cor branco-amareladas, pequenas, encontrando-se em cachos axilares medindo entre 0,5 a 1,0 cm de comprimento, originando a panículas de até 20 cm (CARVALHO, 2003).

Os frutos são do tipo legume indeiscente podendo atingir de 3 a 8 cm de comprimento e com 18 a 22 mm de largura, onde se pode encontrar de uma ou duas sementes pequenas e membranáceas. Possui fruto seco, plano e comprido, adaptado à dispersão anemocórica (CARVALHO, 2003; BORTOLUZZI et al., 2004). A espécie apresenta floração supra-anual, com quantidade de sementes variável ano a ano, ocorrendo nos meses de setembro a outubro e a maturação dos frutos entre novembro e dezembro (CARVALHO, 2003).

Com relação à sua ecologia, é classificada como semicaducifólia, heliófita, secundária tardia, sendo raramente encontrada em regeneração natural, devido ao coelho-do-mato (*Sylvilagus brasiliensis*), seu inimigo natural na fase inicial de sua vida, por se alimentar de suas plântulas, talos e brotos. No estado do Espírito Santo, tem-se relatos de diversas espécies de papagaio que se alimentam dos frutos imaturos, podendo prejudicar a produção de sementes (CARVALHO, 2003).

Em vista destas características, as plantas remanescentes na floresta nativa são comumente encontradas na forma de grupamentos de baixa densidade em locais de difícil acesso (COSTA et al., 1998) e isso tem contribuído para a raridade da espécie. Além disso, a popularidade da madeira que iniciou-se no período do império brasileiro, e por consequência do intenso processo de exploração extrativista, associado com o desmatamento da Mata Atlântica a espécie foi inserida na Lista Vermelha de ameaça de extinção na categoria vulnerável (BRASIL, 2014).

1.2 Propagação vegetativa de espécies florestais

A técnica de propagação vegetativa mais frequentemente utilizada para a clonagem de plantas lenhosas tem sido o enraizamento de estacas, representando um dos maiores avanços tecnológicos na área florestal (XAVIER et al., 2013). Contudo existem limitações em relação às espécies florestais nativas, principalmente no que se refere as diferenças entre genótipos e material adulto (DIAS et al., 2012).

De acordo com Dias et al. (2012) o baixo índice de enraizamento adventício de estacas oriundas de árvores adultas ocorre em virtude da diminuição da capacidade de formar raízes com o aumento da idade, visto que, ramos maduros tendem a ter menor concentração de auxina devido à maior idade ontogenética.

Outro fator que exerce influência é acúmulo de inibidores de enraizamento e redução dos níveis fenólicos à medida que o tecido se torna mais velho, além da barreira anatômica de tecido lignificado entre o floema e o córtex (XAVIER et al., 2013). A maior lignificação dos tecidos impede a formação de raízes, uma vez que a maturação dos tecidos vegetais constitui uma barreira física à emergência das raízes pela deposição de lignina nas paredes celulares, além de reduzir a habilidade fisiológica em formar primórdios radiculares (HARTMANN et al., 2011; XAVIER et al., 2013).

Devido às dificuldades do enraizamento adventício por estaquia, a miniestaquia tem sido empregada na propagação da maioria das espécies florestais em escala comercial. Esta técnica é uma variação da estaquia convencional, cujo princípio é o aproveitamento do potencial juvenil dos propágulos para indução do enraizamento (FERRIANI et al., 2011; XAVIER et al., 2013). A miniestaquia possibilita a obtenção de material vegetativo mais responsivo ao enraizamento adventício, devido ao fato de usar propágulos jovens fisiologicamente, tornando-se uma grande alternativa para espécies de difícil enraizamento (DIAS et al., 2012).

O uso dessa forma de propagação tem possibilitado potencializar os ganhos em uma única geração, mantendo as características favoráveis, evitando a variabilidade encontrada em árvores obtidas a partir de sementes (HIGASHI et al., 2000), em que os ganhos em homogeneidade, produtividade e adaptabilidade, justificam o processo de clonagem.

O interesse na introdução da miniestaquia para diversas espécies se relaciona à redução da área produtiva (adoção do minijardim clonal), que é formada por um conjunto de minicepas, que são mudas podadas em torno de 10 cm de altura, nas quais são coletadas brotações em intervalos regulares.

Em comparação com o jardim clonal em campo, esta técnica permite redução da área necessária para a produção de propágulos, redução dos custos com transporte e coleta das brotações, maior eficiência das atividades de manejo (irrigação, nutrição, manutenções e controle de pragas e doenças), maior percentual de enraizamento, maior variabilidade genética, qualidade do sistema radicular e velocidade de emissão das raízes, necessidade de menores concentrações de reguladores de crescimento e redução do tempo de formação da muda (XAVIER et al., 2013).

Trabalhos com cedro-australiano (*Toona ciliata*) mostram que a propagação assexuada por miniestaquia é viável, quando proveniente de minicepas de origem seminífera (SOUZA et al., 2009; SILVA et al., 2012). Corrêa et al. (2015) analisando o minijardim de *Pinus radiata*, observaram que o inverno e primavera são as melhores estações para o desenvolvimento dos brotos e o verão promoveu melhor desenvolvimento das miniestacas em casa de vegetação, a partir de matrizes cultivadas em sistema de canaletão.

Ferreira et al. (2012) observaram que miniestacas apicais, intermediárias e basais mostraram-se aptas à propagação via miniestaquia de *Toona ciliata* apresentando enraizamento superior a 90% para os três tipos de propágulos avaliados. Isso implica maior aproveitamento das brotações colhidas e otimização da produtividade. Já Badilla et al. (2016) observou que a utilização de AIB em concentrações crescentes não tem efeito significativo no enraizamento de miniestacas de quatro clones de *Tectona grandis*.

Pesquisas têm demonstrado também bons resultados da técnica da miniestaquia na propagação de espécies nativas a partir de uma muda de origem seminal, como a corticeira-do-mato (*Erythrina falcata*), por Cunha et al. (2008), guanandi (*Calophyllum brasiliensis*) por Silva et al. (2010), jequitibá (*Cariniana estrellensis* (Raddi)), por Gatti et al. (2011), angico-vermelho (DIAS et al., 2012), *Anadenanthera macrocarpa* (DIAS et al., 2015a), e o *Handroanthus heptaphyllus* (OLIVEIRA et al., 2016).

Em contrapartida, Santos et al. (2011) estudando o enraizamento de estacas lenhosas, provenientes de ramos de árvores adultas, observaram que as espécies *Tapirira guianensis* (guapiruba), *Sebastiania commersoniana* (branquilho), *Erythrina falcata* (corticeira da serra), *Inga marginata* (ingá feijão), *Inga vera* (ingá do brejo), *Magnolia ovata* (bagaçu), *Maclura tinctoria* (tajuva) e *Casearia sylvestris* (guaçatonga) não demonstraram potencial de enraizamento, mesmo mantidas em condições ambientais favoráveis (27°C de temperatura e 85% de umidade relativa do ar) ao enraizamento adventício.

Os estudos citados comprovam que esta técnica é viável para produção de mudas, a partir de matrizes de origem seminal, em escala comercial, tornando-se uma alternativa bastante promissora, sobretudo nas situações em que a semente é insumo limitante, com baixo índice de germinação ou de difícil armazenamento. Além disso, a técnica pode ser uma alternativa para a produção de mudas de espécies tropicais que produzam sementes insuficientes, para manter-se o programa de produção de mudas destas espécies em um viveiro comercial, como é o caso das espécies que se encontram sob ameaça de extinção (LONGMAN; WILSON, 1993; FERRARI et al., 2004).

Diante disso, as técnicas de propagação vegetativa vêm ao encontro dos objetivos de superação das dificuldades na propagação de espécies nativas, podendo ser utilizadas para diversos fins comerciais e auxiliar na conservação de recursos genéticos florestais (DIAS et al., 2012).

1.3 Fatores que interferem na propagação vegetativa

O fator essencial para o sucesso na propagação vegetativa está na capacidade de enraizamento das estacas. Esta capacidade rizogenética difere consideravelmente entre as espécies arbóreas, podendo ainda ser influenciada por uma série de fatores, que podem atuar isoladamente, ou em conjunto.

Entre os principais fatores que atuam no enraizamento de estacas destacam-se: o genótipo, idade ontogenética e fisiológica das plantas, época do ano, as condições fisiológicas da planta fornecedora das estacas (presença de carboidratos, aminoácidos, auxinas, exsudação de compostos fenólicos, entre outros), com o tipo de estaca, com a

nutrição mineral (vigor vegetativo da planta-matriz e *status*” nutricional do material coletado), com as condições ambientais, luminosidade, umidade, temperatura, o substrato utilizado para o estaqueamento das estacas, e o tratamento das estacas (aplicação de reguladores de crescimento, antioxidantes e co-fatores) (ALFENAS et al., 2009; HARTMANN et al., 2011; TAIZ; ZEIGER, 2013), entre outros.

1.3.1 Nutrição mineral da planta matriz

O manejo nutricional do minijardim clonal é apontado como um dos fatores de maior relevância na produção massal de propágulos vegetativos, devido determinarem a quantidade de carboidratos, auxinas, entre outros compostos metabólicos, fundamentais à indução e ao crescimento das raízes (HIGASHI et al., 2002; CUNHA et al., 2008; ALFENAS et al., 2009; XAVIER et al., 2013).

No que se refere especialmente aos nutrientes minerais, estes possuem funções essenciais e específicas no metabolismo vegetal, podem atuar como componente da estrutura orgânica, ativadores de reações enzimáticas, carreadores de cargas e osmorreguladores (CUNHA et al., 2009; LI et al., 2009). Influenciam também, na determinação de respostas morfogênicas das plantas, com a formação de raízes laterais e a modulação do comprimento e densidade das raízes (ASSIS et al., 2004; HARTMANN et al., 2011).

Rocha et al. (2015) comprovou o efeito da nutrição mineral na produtividade, capacidade e velocidade de enraizamento de miniestacas de um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, onde constataram efeito significativo positivo das doses de nitrogênio aplicada no minijardim clonal nas variáveis estudadas.

Pires et al. (2015) avaliaram duas concentrações contendo diversos macronutrientes e micronutrientes para a *Araucaria angustifolia* constataram que a solução nutritiva mais concentrada aumentou a produção de miniestacas e o crescimento da maior raiz das mudas formadas, ainda, sugeriu mais pesquisas objetivando verificar a concentração ideal e a participação isolada dos nutrientes no processo de miniestaquia.

Cunha et al. (2009) objetivando avaliar o grau de associação linear entre o estado nutricional de minicepas com o enraizamento de miniestacas de clones de

Eucalyptus, verificaram que a nutrição mineral desempenha papel importante no enraizamento adventício das miniestacas, gerando respostas diferenciadas de acordo com o nutriente considerado. Para o nitrogênio, alguns clones tiveram elevação na taxa de enraizamento com o aumento na concentração desse elemento, enquanto outros foram inibidos. O mesmo ocorreu com outros elementos nutricionais como: fósforo, potássio e cálcio, apresentando correlações positivas, negativas e não significativas. Os resultados indicaram que a adubação com solução nutritiva aplicada nas plantas matrizes deve ser específica para cada clone.

Uma alternativa mais prática para a nutrição das plantas é a utilização de fertilizantes de liberação controlada. Esses adubos são grânulos de fertilizantes 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 pesquisados para ter a liberação ideal de nutrientes, onde a taxa de liberação de nutrientes dos FLCs correspondesse à taxa máxima de absorção de nutrientes pelas plantas, que varia dinamicamente durante os estágios de desenvolvimento da planta e a estação de crescimento (IRFAN et al., 2018).

A liberação dos seus nutrientes ocorre através de um processo de difusão que garante a sua disponibilidade numa forma adequada para os requisitos das culturas, minimizando ainda mais as perdas resultantes da lixiviação de adubações tradicionais, o desperdício de nutrientes e os efeitos nocivos da salinidade (TIAN et al., 2016).

A grande vantagem dos fertilizantes nessa suplementação é que apesar de seu custo de aquisição ser elevado, têm sido economicamente viáveis para uso em viveiros florestais, pois, o custo unitário por muda se torna atrativo devido à possibilidade de diminuição de gastos com investimentos em sistemas de fertirrigação e custos com mão-de-obra devido à redução dos sucessivos manejos (MORAES NETO et al., 2003), uma vez que com uma simples aplicação no momento do transplante pode-se suprir a maioria dos nutrientes necessários durante todo o desenvolvimento da planta (FRENCH; ALSBURY, 1989).

Como principal desvantagem, destaca-se que os fertilizantes de liberação controlada não cessam sua liberação, e, portanto não há controle sobre o crescimento

das mudas, caso haja necessidade de estender o período de expedição para campo.

De modo geral, a literatura mostra que as espécies florestais são bastante responsivas a adição de FLC ao substrato. Duboc et al. (2009), comprovou o efeito positivo de doses de fertilizante de liberação controlada em mudas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Rossa et al. (2011) observaram crescimento significativo em altura das mudas de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze e *Ocotea odorifera* (Vell.) Rhower. O uso de fertilizante de liberação lenta também se mostrou eficiente em *Cedrela fissilis* (NAVROSKI et al., 2016), *Moringa oleifera* (ROSA et al., 2018), *Anadenanthera peregrina* (ROSSA et al., 2015) e *Peltophorum dubium* (DUTRA et al., 2016).

Segundo COMPO EXPERT (2016) os fertilizantes de liberação controlada são de grande praticidade, sendo que existem no mercado diversas formulações e períodos de disponibilização dos nutrientes às plantas. É necessário, contudo, estudar a resposta de cada espécie a doses de fertilizantes de liberação controlada, uma vez que um correto fornecimento nutricional permite avaliar o potencial que as mudas terão quando forem colocadas em campo, onde as condições de disponibilidade hídrica e nutricional são mais severas, além da otimização do uso desse insumo.

1.3.2 Uso de fitorreguladores

Os reguladores de crescimento vegetal ou fitorreguladores são substâncias que apresentam efeitos similares ao de fitormônios e que podem ser sintetizadas em laboratório (TAIZ, ZEIGER, 2013). Sua adição tem a finalidade de suprir as prováveis deficiências dos teores endógenos de hormônios (MELO et al., 2001), promovendo, inibindo ou modificando o crescimento e o desenvolvimento das plantas (STUEPP et al., 2015).

Há vários grupos dessas substâncias, entre elas as auxinas, as citocininas e as giberelinas, sendo as auxinas as de maior interesse no enraizamento de estacas de espécies florestais nativas (PAIVA; GOMES, 2011). Dentre os compostos com atividades auxínicas, o ácido-3-indolbutírico (AIB) é o mais utilizado, principalmente por apresentar uma maior estabilidade química no interior da estaca e menor mobilidade (XAVIER et al., 2013).

A aplicação dessa substância, pode-se elevar e acelerar a porcentagem de

enraizamento em estacas, aumentar o número e a qualidade das raízes, bem como uniformizar o enraizamento (OLIVEIRA et al., 2001). Por outro lado, concentrações excessivas de auxina podem inibir o desenvolvimento radicular, causando o amarelecimento e queda das folhas, além de necrose na base da estaca, ocasionando sua morte (HARTMANN et al., 2011).

Nas espécies em que não se encontram estabelecidas técnicas de propagação vegetativa em escala comercial, os estudos tem sido direcionados para a adequação desses métodos já utilizados na propagação de *Eucalyptus* (DIAS et al., 2012). Entretanto, a concentração utilizada para a indução da formação das raízes, varia de acordo com a espécie, clone, estado, tipo de estaca, forma e tempo de aplicação, técnica de propagação utilizada, dentre outras, com variações de 20 a 10.000 mg L⁻¹. Neste sentido, recomenda-se realizar testes prévios com diferentes concentrações, quando não se dispõe de informações a respeito da necessidade de uso e a concentração adequada para a espécie que será propagada (XAVIER et al., 2013).

O uso de AIB tem apresentado resultados satisfatórios em diferentes concentrações veiculadas na forma líquida ou pó para várias espécies propagadas vegetativamente. Em estudo com *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* paricá, utilizou-se as concentrações entre 2.000 e 3.000 ppm do regulador de crescimento ácido indol-3-butírico (AIB) e potencializaram a taxa de enraizamento e melhoraram o sistema radicular das estacas em relação ao número e comprimento de raízes (LIMA et al., 2018). Em consonância, Menezes et al., (2018) com *Aniba rosaeodora*, os resultados indicam que é possível a propagação vegetativa do pau-rosa por estacas e miniestacas independente do uso de auxinas (AIB). Entretanto, as miniestacas apresentaram maior porcentagem de enraizamento (88,7%), sobrevivência (98%), menor tempo de enraizamento (90 dias) em relação às estacas, tornando-se uma alternativa para propagação vegetativa desta espécie.

Oliveira et al. (2012) com *Melaleuca alternifolia* (Cheel.), comprovaram que as miniestacas coletadas da porção apical do ramo, submetidas ao tratamento com 500 mg L⁻¹ de AIB proporcionam maior porcentagem de enraizamento e melhor qualidade do sistema radicial. Para *Varronia curassavica* (erva-baleeira) com 10 anos de idade, os melhores resultados foram observados na concentração de 2.000 mg L⁻¹ (MENDES et

al., 2014), e *Schizolobium amazonicum* (paricá) com 32.000 mg L⁻¹ (DIAS et al., 2015b). Miniestacas de *Acacia baileyana* atingiram até 36% de enraizamento com a aplicação de 5.000 mg L⁻¹ de AIB em estudos de Schwarz *et al.* (2016). Já em *Eucalyptus* spp., com a técnica de miniestaquia, o enraizamento varia desde a não-aplicação até 3.000 mg L⁻¹ (WENDLING et al., 2000; XAVIER et al., 2001; TITON et al., 2003; BORGES et al.; 2011).

1.3.3 Posição do propágulo

No que se refere à posição de origem das estacas caulinares na brotação, estas podem ser classificadas em apicais, medianas ou basais (XAVIER et al., 2013). Normalmente, as miniestacas apicais conferem vantagens se comparadas às intermediárias ou basais, em razão de apresentarem menor grau de lignificação de seus tecidos, conferindo melhor enraizamento (BORGES et al., 2011). No entanto, dada a sua consistência tenra, apresenta o inconveniente de ter baixa resistência a desidratação, com posterior deterioração em condições adversas no processo de enraizamento (XAVIER et al., 2013).

A posição do ramo do qual será retirada a estaca, pode influenciar o enraizamento, devido a uma variação no gradiente de juvenilidade em direção à base e no conteúdo de carboidrato ao longo da brotação. Sendo assim, estacas coletadas de diferentes alturas da mesma brotação podem apresentar diferenças na emissão do sistema radicular (HARTMANN et al., 2011).

No estudo de Dias et al. (2015b), verificaram que a estaca intermediária utilizando a solução de AIB na concentração de 32.000 mg.L⁻¹ apresenta melhores resultados para o enraizamento adventício de *Schizolobium amazonicum*, em relação às apicais. Borges et al. (2011) estudaram o efeito do ácido indol-3-butírico no enraizamento de miniestacas apicais e intermediárias de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *E. grandis* x *E. globulus*, coletadas de minicepas propagadas pelo processo de estaquia convencional, e verificaram que as miniestacas apicais apresentaram melhor enraizamento, sem influência do hormônio testado.

Entretanto, este comportamento não é comum a todas as espécies. Segundo Silva et al. (2010) o enraizamento de miniestacas da espécie arbórea *Calophyllum*

brasiliense, não apresentou diferenças entre miniestacas apicais e intermediárias no enraizamento dos propágulos. Ferreira et al. (2012) observaram que miniestacas apicais, intermediárias e basais mostraram-se aptas à propagação via miniestaquia de *Toona ciliata* apresentando enraizamento superior a 90% para os três tipos de propágulos avaliados.

Desta forma, a escolha da posição apropriada do propágulo deve ser feita com base na facilidade de enraizamento da espécie/clone, no padrão de muda desejada e nas facilidades disponíveis (infraestrutura física, técnica, pessoal e orçamentária) para a propagação vegetativa (XAVIER et al., 2013).

1.4 Aspectos genéticos na produção de mudas de espécies florestais nativas

Na era do antropoceno, a Floresta Atlântica se confirmou como um dos domínios mais prejudicados pela ação antrópica, reduzindo consideravelmente sua cobertura original (WATERS et al., 2016) em aproximadamente 8,5% (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAS - INPE, 2014). Diante dessas ameaças, o Brasil comprometeu-se a reflorestar e promover a regeneração de 12 milhões de hectares até 2030 (BRASIL, 2018).

A produção de mudas de espécies nativas vem ao encontro da superação dos problemas de fragmentação e degradação ambiental. Entretanto, o conhecimento sobre as espécies da Floresta Atlântica é ainda insuficiente, principalmente quanto à questão da diversidade e estruturação genética populacional de suas espécies para fins conservacionistas e de manejo (SOS MATA ATLANTICA, 2018). Espécies alvo para conservação têm, por definição, tamanho populacional pequeno ou em declínio, a exemplo do jacarandá-da-bahia. Populações pequenas e isoladas sofrem endogamia e perda da diversidade genética, o que leva a depressão endogâmica e menor habilidade de evoluírem em resposta as mudanças ambientais (FRANKHAM et al., 2008).

Além disso, as condições ambientais alteradas, tais como clima e do uso da terra de alta intensidade, ameaçam a presença de muitas espécies, e a capacidade das populações de responderem a todas estas pressões, depende em grande medida da diversidade genética da população (BROQUET; PETIT, 2009; LOWE; ALLENDORF, 2010). Assim, restaurar a diversidade genética é um pré-requisito para o

estabelecimento de populações viáveis resistentes a perturbações (RUIZ-JAEN; MITCHELL AIDE; 2005; BRUDVIG, 2011; WORTLEY et al., 2013; MIJANGOS et al., 2015).

Para que as ações de conservação sejam bem sucedidas, é fundamental conhecer como as espécies estão estruturadas em suas populações e como a diversidade genética, que fornece o potencial adaptativo de uma espécie, está estruturada dentro e entre as populações (GALETTI, 2008).

A caracterização genética é essencial não só para determinar genes úteis para possíveis avanços em futuros programas de melhoramento, mas para revelar se os genótipos são promissores e se as fontes de germoplasma são geneticamente diversas. Mudas oriundas de matrizes aparentadas pode levar ao estreitamento da base genética, encadeando em futuras populações desprovidas de variabilidade genética que por consequência, serão mais vulneráveis a doenças, condições climáticas adversas e procriação consanguínea, ameaçando a persistência a longo prazo das espécies (HOFFMANN; SGRO, 2011).

Assim, a propagação de plantas geneticamente distintas é uma importante prática de conservação para espécies em vias de extinção. Espécies que apresentam potencial de propagação vegetativa sofrem menor efeito da deriva genética, uma vez que evita a perda de variabilidade genética na progênie através da clonagem (FISCHER et al., 2000).

A utilização da propagação vegetativa possibilita ainda, fixar características importantes, como o aumento da produção de madeira e subprodutos, compostos químicos, interação de variância genética superiores, manutenção dos níveis de heterozigose, além de permitir maiores êxitos em programas de reflorestamento utilizando espécies florestais nativas, favorecendo a inserção de alelos necessários ao valor adaptativo.

Melo et al. (2015) afirmam que um programa para fins comerciais ou ambientais tem como primeiro, e mais importante passo, a caracterização dessas populações, sendo assim, os critérios genéticos baseados na utilização de marcadores moleculares estão entre os principais métodos. Ainda segundo os autores, dentre os parâmetros genéticos populacionais mais importantes, que fornecem as informações mais

preciosas para os projetos de conservação de espécies ameaçadas estão: o fluxo gênico, as medidas de diversidade genética e o grau de estruturação genética espacial das populações.

1.5 Marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

Os marcadores moleculares são todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SILVA, 2012; TOPPA; JADOSKI, 2013).

Existe um grande número de marcadores moleculares utilizados para avaliar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma dada espécie, estes podem ser divididos em dois grandes grupos, sendo: marcadores baseados na hibridação com sondas específicas e os marcadores baseados na amplificação do DNA via reação de polimerização em cadeia “PCR” (*Polymerase Chain Reaction*) (SILVA, 2012). Podem ainda, ser divididos em marcadores dominantes (RAPD, AFLP, ISSR e em alguns casos os marcadores SCARs) e marcadores codominantes (RFLP, VNTR e SSR) (KOZEN, 2014).

O uso de marcadores ISSR, para a análise genética, tem-se mostrado vantajoso se comparado a outros métodos. Esta constitui uma técnica de menor custo, não necessitando de conhecimento prévio do genoma da espécie objeto de estudo, gerando elevado número de locos polimórficos e alta reprodutibilidade (ZIETKIEWICZ et al., 1994; IDREES; IRSHAD, 2014; NG; TAN, 2015).

Esses marcadores também são considerados ferramentas importantes e têm sido utilizados com sucesso em inúmeros estudos genéticos de plantas que visam a conservação, multiplicação e o melhoramento de espécies florestais e comerciais como *Vicia amoena* (LIU et al., 2013), *Rollinia mucosa* (LORENZONI et al., 2014), *Erythrina velutin* (GONÇALVES et al., 2014), *Hancornia speciosa* (COSTA et al., 2015), *Bertholletia excelsa* (RAMALHO et al., 2016), *Schizolobium parahyba* (JÚNIOR et al., 2017), *Plathymenia reticulata* (SOUZA et al., 2017), *Senefeldera verticillata* (VIEIRA et al., 2018). Em tais pesquisas, os marcadores demonstraram potencial para revelar e quantificar a diversidade genética das espécies.

Do ponto de vista molecular, a diversidade genética é visualizada por meio do polimorfismo, de um ou mais fragmentos de DNA, entre os indivíduos de uma população (RAMALHO et al., 2012). Ramalho et al. (2016) frisam a caracterização molecular como uma importante atividade para o conhecimento no que diz respeito aos germoplasmas. Esse tipo de marcador permite a identificação de ampla variabilidade intra e interespecíficas e, com isso, fundamentam-se como uma ferramenta bastante útil em programas de melhoramento e estudos de diversidade (LORENZONI et al., 2014).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009. 500p.

ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwood with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. **Plantation Forest biotechnology for the 21th century**. New Delhi, India, Research Sign Post, 2004, p. 303-333.

BADILLA, Y.; XAVIER, A.; MURILLO, O.; PAIVA, H. N. D. Iba efficiency on mini-cutting rooting from teak (*Tectona grandis* Linn F.) CLONES. **Revista Árvore**, v. 40, n. 3, p. 477-485, 2016.

BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; MELO, L. A.; ROSADO, A. M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p. 425-434, 2011.

BORTOLUZZI, R. L. C.; CARVALHO-OKANO, R. M.; GARCIA, F. C. P.; TOZZI, A. M. G. A. Leguminosae, Papilionoideae no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica**, v. 18, n. 1, p. 49-71, 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº443, de 17 de dezembro de 2014. **Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/especies-ameacadas-deextincao/atualizacao-das-listas-de-especies-ameacadas>>. Acesso em: 05 ago. 2017.

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

BROQUET, T.; PETIT. E. J. Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, p. 193-216, 2009.

BRUDVIG, L. A. The restoration of biodiversity: where has research been and where does it need to go? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 549-558, 2011.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa, 2003, 1039 p.

COMPO EXPERT. Basacote Plus. Tecnologia COMPO CRF – Eficiência nutricional, otimização de operações e segurança de aplicação. 2016. Disponível em: https://www.compo-expert.com/br/home/produtos/fertilizantes-de-liberacao_controlada-crf.html. Acesso em: 13 set. 2018.

CORRÊA, P. R. R.; SCHULTZ, B.; AUER, C. G.; HIGA, A. R. Efeito da planta matriz, estação do ano e ambiente de cultivo na miniestaquia de *Pinus radiata*. **Floresta**, v. 45, n. 1, p. 65-74, 2015.

COSTA, C.M.R.; HERRMANN, G.; MARTINS, C.S.; LINS, L.V.; LAMAS, I.R. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. In: **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação**. Fundação Biodiversitas, 1998.

COSTA, D. F.; VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

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

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N.; BARROS, N. F.; LEITE, H. G.; LEITE, F. P. Relação do estado nutricional de minicepas com o número de miniestacas de eucalipto. **Scientia Florestais**, v. 36, n. 79, p. 203-213, 2008.

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. P.; BARROS, N. F.; LEITE, H. G.; LEITE, F. P. Relação do estado nutricional de minicepas com o enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 3, p. 591-599, 2009.

DIAS, P. C.; DE OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453, 2012.

DIAS, P. C.; XAVIER, A.; DE OLIVEIRA, L. S.; CORREIA, A. C. G.; BARBOSA, G. A. Tipo de miniestaca e de substrato na propagação vegetativa de Angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan). **Ciência Florestal**, v. 25, n. 4, p. 909-919, 2015a.

DIAS, P. C.; ATAÍDE, G. M.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; PAIVA, H. N. Propagação vegetativa de *Schizolobium amazonicum* por estaquia. **Cerne**, v. 21, n. 3, p. 379-386, 2015b.

DUBOC, E.; FRANÇA, L. V. de; PALUDO, A.; OLIVEIRA, L. dos S. Efeito de doses de fertilizante de liberação controlada em mudas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 18 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 240).

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**, v. 46, n. 4, p. 491-498, 2016.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 222 p.

FERREIRA, D. de A.; BARROSO, D. G.; SILVA, M. S. A. da; SOUZA, J. S. de; FREITAS, T. A. S. de; CARNEIRO, J. G. de A. Influência da posição das miniestacas na qualidade de mudas de cedro australiano e no seu desempenho inicial e no pós-plantio. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 4, p. 715-723, 2012.

FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; HELM, C. V.; BOZA, A.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Produção de brotações e enraizamento de miniestacas de *Piptocarpha angustifolia*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, n. 67, p. 257-264, 2011.

FISCHER, M.; HUSI, R.; PRATI, D.; PEINTINGER, M.; KLEUNEN, M.; SCHMID, B. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, v.87, n.8, p. 1128-1137, 2000.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Editora Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.

FRENCH, C. J.; ALSBURY, J. Comparison of controlled-release fertilizers for production of *Rhododendron Anna Rose Whitney*. **HortScience**, v. 24, n. 1, p. 91-93, 1989.

GALETTI, J. R. P. M. Genética da conservação brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008. 244-274p.

GATTI, K. C.; GONÇALVES, R. C.; XAVIER, A.; PAIVA, H. Propagação vegetativa de Jequitibá (*Cariniana estrellensis* (Raddi) por miniestaquia. **Temas Agrários**, Montería, v. 16, n. 2, p. 54-63, 2011.

GONÇALVES, L. O.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-MANN, R. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutin aWilld.*) em áreas de baixa ocorrência. **Revista de Ciência Agrônômica**, v. 45, n. 2, p. 290-298, 2014.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th. ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011. 900 p.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e sua evolução no Brasil. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, n. 192, p. 1-11, 2000.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N.; Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de Eucalyptus. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba: IPEF, 2002. 24 p.

HOFFMANN, A. A.; SGRÒ, C. M. Climate change and evolutionary adaptation. **Nature**, v. 470, n. 7335, p. 479, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - INPE. **Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações**. Disponível em: <http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3610>. Acesso em: 24 nov. 2018.

IRFAN, S. A.; RAZALI, R.; KUSHAARI, K.; MANSOR, N.; AZEEM, B.; VERSYPT, A. N. F. A review of mathematical modeling and simulation of controlled-release fertilizers. **Journal of Controlled Release**, Estados Unidos, v. 271, n. 10, p. 45-54, 2018.

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.

JÚNIOR, A. S.; SOUZA, L. C.; PEREIRA, A. G.; CALDEIRA, M. V. W.; MIRANDA, F. D. Genetic diversity of *Schizolobium parahyba* var. amazonicum (Huber ex. Ducke) Barneby, in a forest area in Brazil. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 3, 2017.

KOZEN, E.R. Towards conservation strategies for forest tree endangered species: the meaning of population genetic statistics. **Advances in Forestry Science**, v. 1, n. 1, p. 45-51, 2014.

LEÃO, A. C.; VINHA, S. G. Ocorrência do jacarandá no sul da Bahia. In: **Cacau Atualidades**. v. 12, p. 22-29, 1975.

LI, S. W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, v. 75, n. 2, p. 230-247, 2009.

LIMA, C. C.; OHASHI, S. T.; SILVEIRA, A. S. Efeito de diferentes concentrações de AIB e procedências geográficas no enraizamento de estacas de paricá. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 3, p. 1282-1292, 2018.

LIMA, H. C. de 2015. *Dalbergia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22915>>. Acesso em: 10 de out de 2018.

LIU, C.; GE, Y.; WANG, D. J.; LI, X.; YANG, X. X.; CUI, C. S.; QU, S. P. Morphological and molecular diversity in a germplasm collection of seed pumpkin. **Scientia horticulturae**, v. 154, p. 8-16, 2013.

LONGMAN, K. A.; WILSON, R. H. F. **Tropical trees: propagation and planting manuals. 1. Rooting cuttings of tropical trees.** 1993. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/006/ad231e/ad231e00.HTM>. Acesso em: 16 de ago de 2018.

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

LORENZONI, R. M.; SOARES, T. C. B.; SANTIAGO, V. F.; SILVA, J. A.; COELHO, R. I. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 251-257, 2014.

LOWE, W.; ALLENDORF, F. What can genetics tell us about population connectivity? **Molecular Ecology**, v. 19, n. 15, p. 3038-3051, 2010.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Efeito de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea de plântula de guarirubeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**, Uberlândia,, v. 17, n. 1, p. 49-59, 2001.

MELO, A. T. O.; COELHO, A. S. G.; PEREIRA, M. F.; BLANCO, A. J. V.; FRANCESCHINELLI, E. V. Genética da conservação de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.(Meliaceae) em fragmentos florestais de mata atlântica na APA Fernão Dias. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 365-374, 2015.

MENDES, A. D. R.; LACERDA, T. H. S.; ROCHA, S. M. G.; MARTINS, E. R. Reguladores vegetais e substratos no enraizamento de estacas de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 262-270, 2014.

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

MIJANGOS, J. L.; PACIONI, C.; SPENCER, P. B. S.; CRAIG, M. D. Contribution of genetics to ecological restoration. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 1, p. 22-37, 2015.

MORAES NETO, S. P.; GONÇALVES, J. L. M.; RODRIGUES, C. J.; GERES, W. L. A.; DUCATTI, F.; AGUIRRE JÚNIO, J. H. Produção de mudas de espécies arbóreas nativas com combinações de adubos de liberação controlada e prontamente solúveis. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 779-789, 2003.

NAVROSKI, M. C.; TONETT, E. L.; MAZZO, M. V.; FRIGOTTO, T.; DE OLIVEIRA PEREIRA, M.; GALVANI, L. V. Procedência e adubação no crescimento inicial de mudas de cedro. **Pesquisa florestal brasileira**, v. 36, n. 85, p. 17-24, 2016.

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

OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, J. F.; RIOS, M. N. da S.; REZENDE, M. E. Enraizamento de estacas para produção de mudas de espécies nativas de matas de galeria. **Embrapa Cerrados**, Brasília, 2001. (Recomendação Técnica n.41).

OLIVEIRA, Y.; ALCANTARA, G. B.; GUEDES, I.; PINTO, F.; QUOIRIN, M.; BIASI, L. A. Substratos, concentrações de ácido indolbutírico e tipos de miniestacas no enraizamento de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 611-616, 2012.

OLIVEIRA, T. P. F.; BARROSO, D. G.; LAMÔNICA, K. R.; CARVALHO, G. C. M. W. Aplicação de AIB e tipo de miniestacas na produção de mudas de *Handroanthus heptaphyllus* Mattos. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 299-306, 2016.

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

PIRES, P.; WENDLING, I.; AUER, C.; BRONDANI, G. Sazonalidade e soluções nutritivas na miniestaquia de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 283-293, 2015.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 5. Ed. Lavras: UFLA, 2012. 566p.

RAMALHO, A. B.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; ZORTÉA, K. É. M.; TIAGO, A. V.; MARTINS, K. C. 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. T.; BACKES, C. B.; BORELLI, K.; PRIETO, M. R.; SANTOS, A. J. M.; GODINHO, T. O. 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, p. 273-279, 2015.

ROSA, T. L. M.; JORDAIM, R. B.; ALEXANDRE, R. S.; ARAÚJO, C. P.; GONÇALVES, F. G.; LOPES, J. C. Controlled release fertilizer in the growth of *Moringa oleifera* LAM. seedlings. **Floresta**, v. 48, n. 3, p. 303-310, 2018.

ROSSA, Ü. B.; ANGELO, A. C.; NOGUEIRA, A. C.; REISSMANN, C. B.; GROSSI, F.; RAMOS, M. R. Fertilizante de liberação lenta no crescimento de mudas de *Araucaria angustifolia* e *Ocotea odorifera*. **Revista Floresta**, v. 41, n. 3, p. 491-500, 2011.

ROSSA, Ü. B.; ANGELO, A. C.; WESTPHALEN, D. J.; DE OLIVEIRA, F. E. M.; DA SILVA, F. F.; DE ARAUJO, J. C. Fertilizante de liberação lenta no desenvolvimento de mudas de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (angico-vermelho) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha). **Ciência Florestal**, v. 25, n. 4, p. 841-852, 2015.

RUIZ-JAEN, M. C.; AIDE, T. Restoration success: how is it being measured? **Restoration ecology**, v. 13, n. 3, p. 569-577, 2005.

SANTOS, J. P.; DAVIDE, A. C.; TEIXEIRA, L. A. F.; MELO, A. S.; MELO, L. A. Enraizamento de estacas lenhosas de espécies florestais. **Cerne**, v. 17, n. 3, p. 293-301, 2011.

SCHWARZS, J. L.; GLOCKE, P. L.; SEDGLEY, M. Adventitious root formation in *Acacia baileyana* F. Muell. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 561-565, 1999.

SILVA JÚNIOR, M. C. **100 árvores do Cerrado-sentido restrito**: guia de campo. Brasília. 304p. 2012.

SILVA, R. L. da; OLIVEIRA, M. L. de; MONTE, M. A. XAVIER, A. Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. **Agronomía Costarricense**, v. 34, n. 1, p. 99-104, 2010.

SILVA, A. V. C. O uso de marcadores moleculares na pesquisa agropecuária. Brasília-DF: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012, 65 p.

SILVA, M. P. S.; BARROSO, D. G.; SOUZA, J. S.; FERREIRA, D. A.; CARNEIRO, J. G. A. Enraizamento de miniestacas e produtividade de minicepas de cedro australiano manejadas em canaletões e tubetes. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 4, p. 703-713, 2012.

SOS MATA ATLÂNTICA. A Mata Atlântica. Disponível em: <http://www.sosma.org.br/>. Acesso: 15 de julho de 2018.

SOUZA, J. C. A. V. de; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. A.; TEIXEIRA, S. L.; BALBINOT, E. Propagação vegetativa de cedro-australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 33, n. 2, p. 205-213, 2009.

SOUZA, L. C.; JÚNIOR, A. L. S.; SOUZA, M. C.; KUNZ, S. H.; MIRANDA, F. D. Genetic diversity of *Plathymenia reticulata* Benth. in fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 3, 2017.

STUEPP, C. A.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Estaquia de árvores adultas de *Paulownia fortunei* var. Mikado a partir de brotações epicórmicas de decepa. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 667-677, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TIAN, C.; ZHOU, X.; LIU, Q.; PENG, J. W.; WANG, W. M.; ZHANG, Z. H.; GUAN, C. Y. Effects of a controlled-release fertilizer on yield, nutrient uptake, and fertilizer usage efficiency in early ripening rapeseed (*Brassica napus* L.). **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, Zhejiang, v. 17, n. 10, p. 775-786, 2016.

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

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.

VIEIRA, A. A. R.; JÚNIOR, A. S.; SOUZA, L. C.; MIRANDA, F. D.; FERREIRA, M. F. S.; CALDEIRA, M. V. W. Genetic structure and diversity of *Senefeldera verticillata* (Euphorbiaceae) in semideciduous seasonal forest fragments. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 3, 2018.

WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J. M.; PIRES, I. E.; ANDRADE, H. B. Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 24, n. 2, p. 187-192, 2000.

WORTLEY, L.; HERO, J. M., HOWES, M. Evaluating ecological restoration success: a review of the literature. **Restoration Ecology**, v. 21, n. 5, p. 537-543, 2013.

XAVIER, A.; ANDRADE, H. B.; OLIVEIRA, M. D.; WENDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de híbrido de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.

XAVIER A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed., Viçosa, MG: UFV, 2013. 278 p.

WATERS, C. N.; ZALASIEWICZ, J.; SUMMERHAYES, C.; BARNOSKY, A. D.; POIRIER, C.; GAŁUSZKA, A.; JEANDEL, C. he Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. **Science**, v. 351, n. 6269, p. aad2622, 2016.

**CAPÍTULO I – PROCEDÊNCIAS E FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE *Dalbergia nigra***

Artigo aceito para publicação na revista Floresta

RESUMO

SANTOS, Aline Ramalho dos. **Procedências e fertilizante de liberação controlada no crescimento de mudas de *Dalbergia nigra***. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Coorientador: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda.

Para a viabilização de projetos de restauração florestal é fundamental que a produção de mudas florestais nativas em quantidade, que as mesmas possuam maior vigor vegetativo e bom estado nutricional. Neste contexto, objetivou-se avaliar no presente trabalho, o crescimento de mudas de duas procedências de *Dalbergia nigra*, cultivadas em substrato acrescidos de diferentes doses de fertilizante de liberação controlada (FLC). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, dispostos em esquema fatorial 2 x 4, referentes a duas procedências de sementes de *D. nigra* (Viçosa, MG e Linhares, ES) e quatro doses (0; 2; 4 e 8 kg m⁻³) do FLC Basacote® Mini 6M, cuja formulação é 13-6-16, com tempo de liberação de 5 a 6 meses, com quatro repetições e 126 mudas por parcela. Aos 120 dias após semeadura, as mudas foram coletadas para mensuração das variáveis relacionadas ao crescimento. A altura das mudas aos 120 dias, massa seca da raiz, da parte aérea e total foram influenciados significativamente pela interação ($p \leq 0,05$) entre os fatores doses de FLC e procedências de *D. nigra*. A procedência Linhares, apresenta melhores resultados de crescimento e produção de matéria seca de mudas de *D. nigra*. Recomenda-se dose 7,46 kg m⁻³ de fertilizante de liberação controlada para a procedência Linhares e a dose 5,99 kg m⁻³ para a procedência Viçosa, visando a maximização do crescimento de produção de mudas de *D. nigra*.

Palavras-chave: jacarandá-da-bahia, propagação de plantas, silvicultura, restauração florestal, nutrição florestal.

ABSTRACT

SANTOS, Aline Ramalho dos. **Proceedings and controlled release fertilizer on the growth of *Dalbergia nigra* seedlings**. 2019. Dissertation (Master of Forest Science) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Prof^a. Dr^a. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Co-adviser: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda.

For the feasibility of forestry restoration projects it is fundamental that in the production of native forest seedlings in quantity, that the same ones have greater vegetative vigor and good nutritional status. In this context, the objective of this work was to evaluate the growth of two *Dalbergia nigra* seedlings grown in substrate grown with different doses of controlled release fertilizer (FLC). The experimental design was in randomized blocks, arranged in a factorial scheme 2 x 4, referring to two seed sources of *D. nigra* (Viçosa, MG and Linhares, ES) and four doses (0, 2, 4 and 8 kg m⁻³) of the FLC Basacote[®] Mini 6M, whose formulation is 13-6-16, with release time of 5 to 6 months, with four replications and 126 seedlings per plot. At 120 days after sowing, the seedlings were collected to measure the variables related to growth. The height of the seedlings at 120 days, dry mass of the root, shoot and total were significantly influenced by the interaction ($p \leq 0.05$) between the FLC dose factors and *D. nigra* origins. The origin Linhares, presents better growth and dry matter production of *D. nigra* seedlings. It is recommended to dose 7.46 kg m⁻³ of controlled release fertilizer to the Linhares provenance and the 5.99 kg m⁻³ dose to the Viçosa, provenance, aiming at maximizing seedling growth of *D. nigra*.

Keywords: jacarandá-da-bahia, plant propagation, forestry, forest restoration, forest nutrition.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil comprometeu-se a reflorestar e promover a regeneração de 12 milhões de hectares até 2030 no acordo de Paris assinado em 2015 (BRASIL, 2018). A produção de mudas de espécies nativas vem ao encontro da superação das dificuldades do agravamento de problemas fragmentação e degradação ambiental. A maioria dos produtores de mudas de espécies nativas utiliza substrato padrão composto por amostras subsuperficiais de solo e uma fonte de matéria orgânica, prática que vem gradualmente sendo substituída por substratos comerciais. Segundo Serrano et al. (2012) é característico dos substratos comerciais a dependência de aplicações de fertilizantes minerais por meio de frequentes pulverizações foliares, cobertura ou fertirrigação, que pode resultar no aumento dos custos de produção.

Os fertilizantes de liberação controlada (FLC) 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 pesquisados para ter a liberação ideal de nutrientes, onde a taxa de liberação correspondesse à taxa máxima de absorção de nutrientes pelas plantas, que varia dinamicamente durante os estágios de desenvolvimento da planta durante a estação de crescimento (IRFAN et al., 2018). 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 (13-06-16), na dose de 5,37 kg m⁻³ de substrato.

Jacarandá caviúna ou Jacarandá-Bahia são nomes populares da *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth, uma Fabaceae arbórea, endêmica da Floresta Atlântica. Devido a beleza natural e as propriedades tecnológicas da sua madeira foi alvo de intensa exploração extrativista, que somado à degradação do seu ambiente natural, resultou em populações reduzidas as fragmentos florestais isolados e unidades de conservação (CARVALHO, 2003). Por conseguinte, encontra-se atualmente listada como espécie ameaçada de extinção e seu comércio nacional e internacional proibido (RESENDE et al., 2011).

A obtenção de populações melhoradas que atendam às exigências da produtividade florestal, ou de recuperação ambiental, depende da capacidade da

identificação de genótipos desejados na população sob essa seleção. Segundo Sampaio et al. (2000) uma das estratégias de eficiência comprovada para seleção de genótipos é a combinação de testes de procedências e progênies. A variabilidade entre as populações sempre foi alvo de estudos em diferentes espécies, tendo em vista conhecer e explorar essa variabilidade em programas de melhoramento e conservação genética. Baseando-se nisso, as populações de diferentes origens geográficas podem apresentar diferenças genéticas que surgiram da adaptação às condições ambientais locais em que vivem (OHASHI et al., 2010).

Diante disso, objetivou-se com este estudo analisar o crescimento de mudas de duas procedências de *D. nigra* 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 de mudas *D. nigra*.

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 (DCFEM-CCA-UFES), em Jerônimo Monteiro, ES, durante os meses agosto 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 (KÖPPEN, 1948).

As sementes de *D. nigra* foram coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais, e Linhares, Espírito Santo, ambos no Brasil, adquiridas via comercialização realizada por empresa registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Tabela 1.1).

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 °C	Altitude média (m)	Umidade relativa (%)	Horas 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 *D. nigra* (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, na tabela 1.2 encontra-se a caracterização químico-física do FLC. Cada unidade experimental foi constituída por 126 mudas, totalizando 4.032 mudas.

Tabela 1.2 - Caracterização químico-física do fertilizante de liberação controlada

N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Mg	S	Fe	Cu	Mn	Mo	Diâmetro de 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: Compo expert, 2018.

As diferentes doses de FLC foram adicionadas ao 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 $0,5 \text{ g cm}^{-3}$, umidade de 55%, condutividade elétrica $0,4 \text{ mS cm}^{-1}$ e homogeneizadas manualmente com auxílio de enxadas, antes do preenchimento dos tubos para que todos recebessem quantidades iguais de grânulos, de acordo com cada tratamento.

A semeadura foi realizada a 0,3 cm de profundidade em tubetes de polipropileno de 280 cm^3 , 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 três sementes, previamente desinfestadas em álcool 70% sob agitação durante um minuto e solução de hipoclorito de sódio (2%) por cinco minutos, seguido de tríplice lavagem em água destilada.

Aos 15 dias após a emergência, efetuou-se um primeiro raleio deixando-se duas plantas por tubete. Decorridos 30 dias após a semeadura, um segundo raleio foi realizado, deixando-se apenas uma muda por tubete.

Foram analisados a porcentagem de emergência (E, %), 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 determinados as seguintes variáveis: 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; número de folhas (NF), determinada por meio da contagem do número de folhas visíveis; teor de clorofila das folhas (CFT, $\mu\text{g cm}^{-2}$), realizado em amostras de folhas intermediárias das mudas por meio de medidor portátil de clorofila SPAD-502. A determinação da CFT foi realizada somente nas doses 2,0; 4,0 e $8,0 \text{ kg m}^{-3}$, uma vez que o baixo crescimento foliar das mudas do tratamento 0 (testemunha) não permitiu a leitura com o aparelho citado.

Para determinação da massa seca da parte aérea (MSPA, g planta^{-1}) e massa seca de raízes (MSR, g planta^{-1}), quatro mudas por repetição foram coletadas

aleatoriamente, 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 planta⁻¹). Em seguida, o material foi acondicionado em sacos de papel e colocados 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 massa seca total (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), (DICKSON et al., 1960).

Os dados foram submetidos ao teste de verificação de pressuposição de normalidade (Shapiro Wilk). As variáveis E (%), DC (120 dias), H (120 dias), NF (120 dias), CR, MSR, MSPA, MST e IQD apresentaram os resultados de p-valor abaixo de 0,05, não possuindo suas distribuições normais dos resíduos, o que levou à transformação dos dados com uso da função $Y = \text{raiz}(x + 1)$, entretanto, apresentados na versão original. Em seguida 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

De acordo com os resultados na análise de variância, verifica-se que houve interação ($p \leq 0,05$) entre os fatores doses de FLC e procedências de *D. nigra* para as variáveis H aos 120 dias, MSR, MSPA e MST, evidenciando que a ação conjunta dos fatores influenciou a expressão dessas características. As doses de FLC influenciaram todas as variáveis estudadas com exceção do TME. A procedência do ES apresentou valores maiores de IVE, E e IQD, ao passo que a procedência MG apresentou um menor TME e NF (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 - Análise de variância e teste médias das variáveis de crescimento de duas procedências de *D. nigra* submetidas a diferentes doses de fertilizantes de liberação controlada.

FV	GL	Quadrados médios					
		IVE	E (%)	TME (dias)	DC 60 (mm)	H 60 (mm)	NF 60 (Un.)
Doses	3	2,125**	2,546*	0,303 ^{ns}	0,262**	27,661**	19,70**
Procedência	1	5,104**	11,970**	29,376**	0,039 ^{ns}	5,925 ^{ns}	1,757 ^{ns}
D x P	3	0,360 ^{ns}	0,489 ^{ns}	0,258 ^{ns}	0,015 ^{ns}	0,695 ^{ns}	1,825 ^{ns}
Bloco	3	0,189 ^{ns}	0,281 ^{ns}	0,349 ^{ns}	0,057 ^{ns}	0,897 ^{ns}	2,341 ^{ns}
Resíduo	21	0,429	0,586	0,331	0,028	1,96	1,678
CV %		22,90	11,99	3,12	14,87	28,44	24,04
Média ES		3,26 a	48,90 a	19,41 b	1,11 a	4,50 a	5,62 a
Média MG		2,46 b	32,88 b	17,50 a	1,18 a	5,36 a	5,15 a

FV	GL	Quadrados médios					
		DC 90 (mm)	H 90 (mm)	NF 90 (Un.)	DC 120 (mm)	H 120 (mm)	NF 120 (Un.)
Doses	3	3,193**	511,52**	355,18**	1,086**	27,44**	24,294**
Procedência	1	0,241 ^{ns}	29,10 ^{ns}	0,236 ^{ns}	0,022 ^{ns}	0,35 ^{ns}	1,081*
D x P	3	0,124 ^{ns}	28,62 ^{ns}	2,116 ^{ns}	0,027 ^{ns}	1,22**	0,088 ^{ns}
Bloco	3	0,186 ^{ns}	18,44 ^{ns}	6,054 ^{ns}	0,027 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,554 ^{ns}
Resíduo	21	0,113	14,07	14,12	0,010	0,19	0,177
CV %		17,96	27,57	28,05	5,20	9,45	9,15
Média ES		1,96 a	14,56 a	13,31 a	3,09 a	25,05 a	20,93 b
Média MG		1,78 a	12,65 a	13,48 a	2,85 a	21,58 a	24,41 a

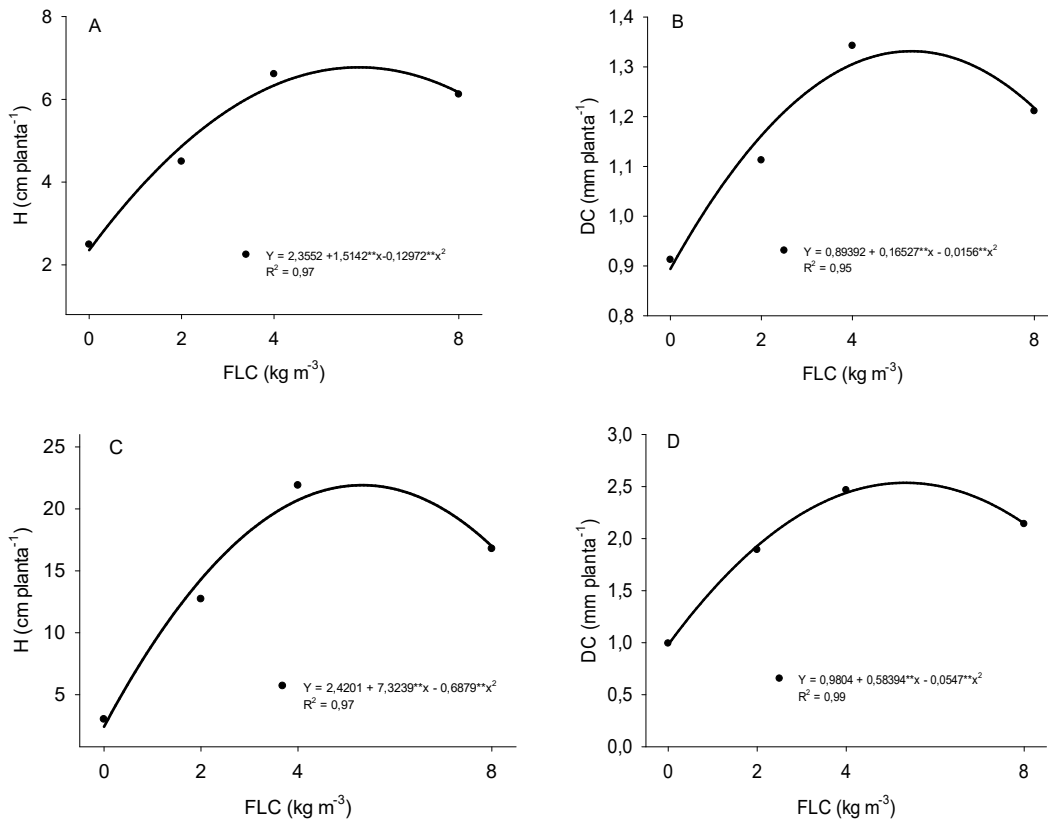
FV	GL	Quadrados médios				
		CR (cm)	MSR (g)	MSPA (g)	MST (g)	IQD
Doses	3	0,312**	0,303**	0,907**	1,663**	0,123**
Procedência	1	0,073 ^{ns}	0,039**	0,037*	0,097*	0,008*
D x P	3	0,006 ^{ns}	0,016*	0,029*	0,057*	0,003 ^{ns}
Bloco	3	0,175 ^{ns}	0,006 ^{ns}	0,023 ^{ns}	0,035 ^{ns}	0,004 ^{ns}
Resíduo	21	0,030	0,003	0,007	0,013	0,001
CV %		3,75	4,53	6,17	7,19	24,68
Média ES		21,23 a	0,75 a	1,20 a	1,96 a	0,19 a
Média MG		20,33 a	0,55 b	0,96 b	1,52 b	0,15 b

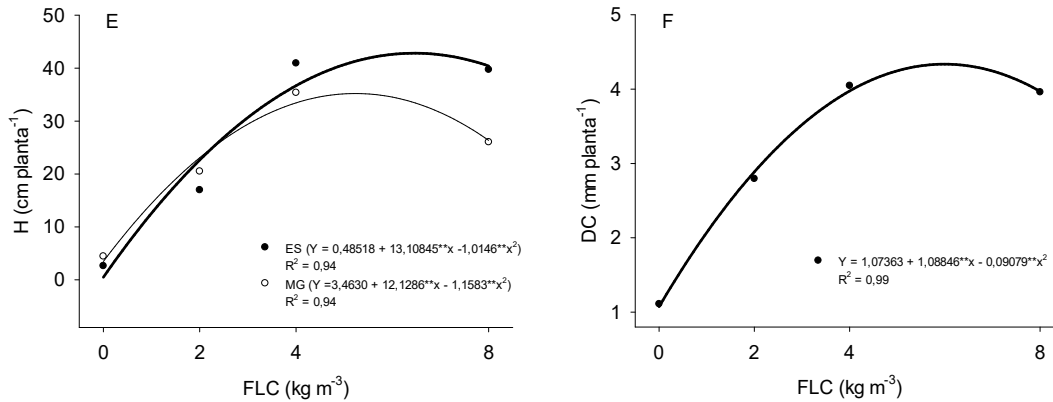
FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; CV%: coeficiente de variação; IVE: índice de velocidade de emergência; E: emergência; TME: tempo médio de emergência; DC: diâmetro do coleto; H: altura da parte aérea; NF: número de folhas; CR: comprimento de raiz; MSR: massa seca da raiz; MSPA: massa seca da parte aérea; MST: massa seca total; IQD: índice de qualidade de Dickson. * e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente; ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

As doses de FLC influenciaram ($p \leq 0,05$) negativamente a E e o IVE, contudo não houve significado biológico dos modelos de regressão testados, a média para a E corresponde a 40,89 e para o IVE de 2,86.

A H máxima de 6,77 cm planta⁻¹ aos 60 dias foi observada na dose estimada 5,83 kg m⁻³ (Figura 2.1A). O maior crescimento em DC aos 60 dias foi de 1,33 mm planta⁻¹ na dose 5,29 kg m⁻³ (Figura 2.1B).

Figura 2.1 - (A) Altura aos 60 dias; (B) diâmetro do coleto aos 60 dias; (C) Altura aos 90 dias; (D) diâmetro do coleto aos 90 dias; (E) Altura aos 120 dias; (F) diâmetro do coleto aos 120 dias de plântulas de *D. nigra* em função de doses de fertilizante controlada, Jerônimo Monteiro, Brasil, 2019.



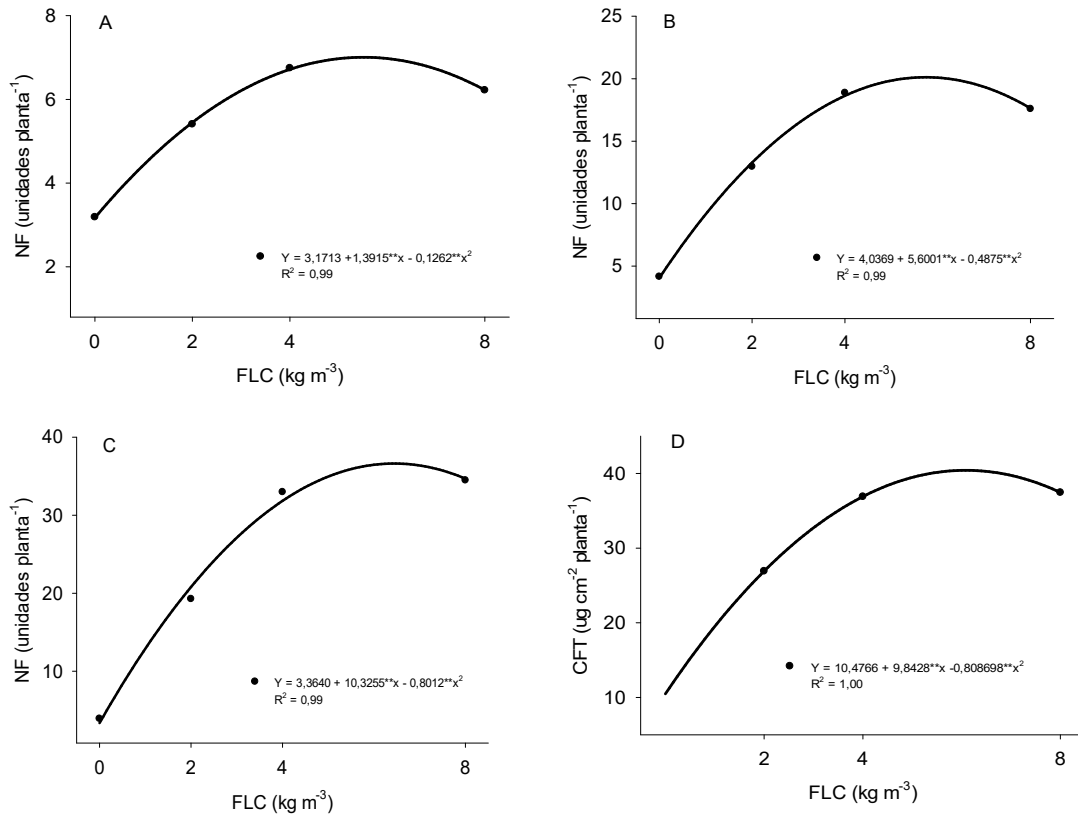


A H máxima aos 90 dias, de 21,91 cm planta⁻¹ foi observada na dose estimada 5,32 kg m⁻³ (Figura 2.1C). O maior crescimento em DC aos 90 dias foi de 2,53 mm planta⁻¹ na dose 5,32 kg m⁻³ (Figura 2.1D).

Houve interação entre os fatores doses de FLC e as procedências, onde a H aos 120 dias máxima foi 42,82 cm planta⁻¹ para as mudas da procedência ES, sendo observada na dose estimada 6,45 kg m⁻³. Para a procedência MG a dose 5,23 kg m⁻³ promoveu a maior H média, 35,21 cm planta⁻¹ (Figura 2.1E). O maior crescimento em DC aos 120 dias foi de 4,33 mm planta⁻¹ na dose 5,99 kg m⁻³ (Figura 2.1F).

Houve efeito isolado das doses de FLC para a NF nas três épocas de avaliação, com tendência de crescimento quadrática aos 60, 90 e 120 dias com valor máximo 7,00; 20,11 e 36,63 folhas nas doses máximas estimadas 5,51; 5,74 e 6,44 kg m⁻³ respectivamente (Figuras 2.2A, 2.2B, 2.2C). Para a CFT aos 120 dias, o maior valor, de 40,42 ug cm⁻² planta⁻¹ foi observado na dose estimada 6,08 kg m⁻³ de FLC (Figura 2.2).

Figura 2.2 - (A) número de folhas aos 60 dias; (B) número de folhas aos 90 dias; (C) número de folhas 120 dias; (D) clorofila foliar total aos 120 dias de plântulas de *D. nigra* em função de doses de fertilizante controlada, Jerônimo Monteiro, Brasil, 2019.



As doses FLC promoveram crescimento linear crescente do sistema radicular, onde o máximo CR ($22,75 \text{ cm planta}^{-1}$) foi observado na dose 8 kg m^{-3} (Figura 2.3A).

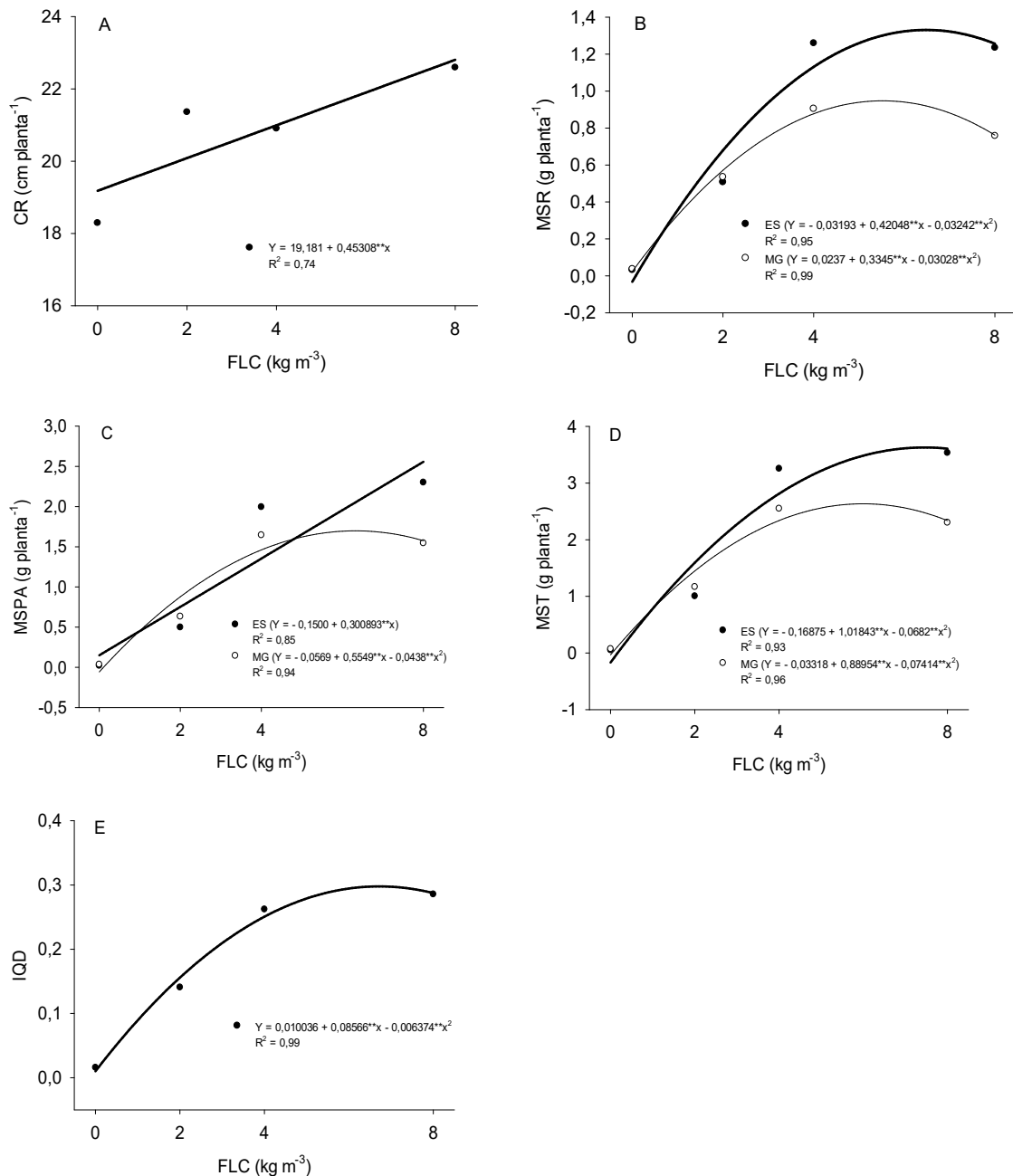
Para a MSR houve interação ($p \leq 0,05$) entre as procedências e as doses de FLC, em que as mudas de *D. nigra* provindas de ES tiveram o valor máximo de $1,33 \text{ g planta}^{-1}$ na dose $6,48 \text{ kg m}^{-3}$ (Figura 2.3B). Enquanto as mudas da procedência MG apresentaram o valor máximo de $0,94 \text{ g planta}^{-1}$ alcançado na dose $5,52 \text{ kg m}^{-3}$.

Quanto à produção de MSPA, houve duas tendências de crescimento, a maior produção em MSPA, $2,55 \text{ g planta}^{-1}$, foi observado para a procedência ES na dose 8 kg m^{-3} , com tendência de crescimento linear crescente. Já a procedência MG, a produção máxima em MSPA foi de $1,70 \text{ g planta}^{-1}$ na dose estimada $6,33 \text{ kg m}^{-3}$ (Figura 2.3C).

Para a produção de MST, a procedência ES apresentou um maior crescimento em relação a MG, com valor máximo de $3,63 \text{ g planta}^{-1}$ na dose de $7,46 \text{ kg m}^{-3}$ (Figura

2.3D). Enquanto que a procedência MG apresentou máxima produção em MST de 2,63 g planta⁻¹ na dose estimada de FLC 5,99 kg m⁻³. O IQD máximo foi de 0,29 obtido na dose estimada 6,71 kg m⁻³ (Figura 2.3E).

Figura 2.3 - (A) comprimento do sistema radicular; (B) massa seca da raiz; (C) massa seca da parte aérea; (D) massa seca total; (E) índice de qualidade de Dickson de mudas de *D. nigra* em função de doses de fertilizante controlada, Jerônimo Monteiro, Brasil, 2019.



4. DISCUSSÃO

Observa-se decréscimos nos valores de E e IVE de plântulas de *D. nigra* com as doses de FLC, que podem ser justificado pelas características intrínsecas do fertilizante, como higroscopicidade e salinidade, que provocam o efeito deletério sobre o tegumento das sementes, ocasionando extravasamento dos eletrólitos. Resultado semelhante foi encontrado Freitas et al. (2011) em experimento realizado com abacaxi, em que doses maiores de FLC proporcionam redução do pH dos substratos, acarretando na solubilização do alumínio tóxico, conseqüentemente redução no crescimento das plantas. Assim, sugere-se a utilização, quando possível, de duas ou mais sementes por recipiente para evitar subutilização de tubetes e espaço no viveiro.

De modo geral, comprova-se a hipótese de que as doses de FLC influenciam o crescimento de mudas de *D. nigra*, promovendo ganhos expressivos em ambas as procedências, com destaque para as variáveis H, DC, MST, com implicação no IQD. A H e o DC são características não destrutivas, de fácil mensuração, utilizadas para avaliar o crescimento e a qualidade das mudas arbóreas no viveiro e podem estar correlacionados com a sobrevivência e o crescimento das plântulas no campo.

A produção de massa seca, tanto de raiz, da parte aérea e total, é considerada uma variável importante para descrever o crescimento e qualidade de mudas. Segundo Larcher (2006) o crescimento vegetativo é o resultado da diferença entre ganhos em carbono via fotossíntese e as perdas via respiração (saldo do balanço de CO₂), assim, o carbono não consumido no processo respiratório aumenta a massa seca da planta. Assim, acredita-se que quanto maior o valor da MST, melhor será a qualidade da muda produzida, a sobrevivência e o crescimento das plantas após o transplante no campo.

O FLC, portanto, antecipou o desenvolvimento das mudas e garantiu melhores condições para que a planta atingisse o seu máximo potencial produtivo, tanto nas medições de parte aérea, quanto nas do sistema radicular, tornando-as aptas para o transplante em campo 90 dias após a emergência.

Sob perspectiva de recuperação de áreas degradadas e plantios comerciais, mudas de qualidade, com máximo crescimento em viveiro podem se estabelecer mais rapidamente em campo, recobrando o solo, criando condições microclimáticas ideais para o estabelecimento de outras espécies vegetais, iniciando assim os processos de

sucessão e ciclagem de nutrientes. Sob ótica de sistemas silvipastoris, quanto mais rápido for o crescimento inicial em campo do componente florestal, mais rápido pode ser a entrada de animais na área, sem prejuízo para a qualidade das árvores.

Esse tipo de fertilizante apresenta 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.

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 constataram que 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 melhores 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. Apesar dos notórios avanços na silvicultura de espécies nativas, são necessários estudos visando estabelecer condições nutricionais ótimas para cada espécie cultivada. Observa-se ainda que a procedência ES foi mais responsiva a adição de FLC em relação à MG quanto à produção de matéria seca de raiz, parte aérea e total. Segundo Ferreira e Araújo (1981), a importância de se trabalhar com sementes oriundas de localidades distintas sob ótica geográfica e climática permite constatar as diferenças genéticas dentro da espécie, e as diferenças fenotípicas determinadas pelas variações ambientais. Conhecendo a variabilidade natural, podem-se selecionar indivíduos ou materiais que reúnam características superiores, e assim fornecer informações de potenciais genitores a serem utilizados em programas de melhoramento (BORÉM; MIRANDA, 2009). Segundo Botezelli et al. (2000) o estudo de procedências

distintas, torna possível capturar várias expressões do genótipo, possibilitadas pelas diferentes condições ambientais do local de ocorrência.

5. CONCLUSÕES

A procedência de Linhares apresentou melhores resultados de crescimento e produção de matéria seca de mudas de *D. nigra*.

Recomenda-se dose 7,46 kg m⁻³ de fertilizante de liberação controlada para a procedência Linhares e a dose 5,99 kg m⁻³ para a procedência Viçosa, visando a maximização do crescimento e produção de mudas de *D. nigra*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 5 ed. 2009, 529 p.
- BOTEZELLI, L.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). **Cerne**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 9-18, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf />. Acesso em: 10 dez. 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Acordo de Paris**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/convencao-das-nacoes-unidas/acordo-de-paris>>. Acesso em: 19 jun 2018.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa, 2003, 1039 p.
- COMPO EXPERT. Fertilizantes de Liberação Controlada (CRF - Controlled Release Fertilizer). Disponível em: <<https://www.compo-expert.com/br/informacoes/catalogos-folhetos-e-programas-nutricionais.html>>. Acesso em: 13 set. 2018.
- DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forestry Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960.
- 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**, Curitiba, v. 46, n. 4, p. 491-498, 2016.
- 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.
- FERREIRA, M.; ARAÚJO, A. J. **Procedimentos e recomendações para teste de procedência**. Curitiba: EMBRAPA, 1981, 28 p.
- FREITAS, S. J.; CARVALHO, A. J. C.; BERILLI, S. S.; SANTOS, P. C.; MARINHO, C. S. Substratos e Osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. vitória. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 672-679, 2011.
- GONÇALVES, E. O.; PAIVA, H. N.; NEVES, J. C. L.; KLIPPEL, V. H.; CALDEIRA, M. V. W. Growth of Jacaranda-da-Bahia (*Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr. All. ex Benth)) under different levels of NPK. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 3, p. 493 -500, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. **Dados meteorológicos**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 11/09/2018.

IRFAN, S. A.; RAZALI, R.; KUSHAARI, K.; MANSOR, N.; AZEEM, B.; VERSYPT, A. N. F. A review of mathematical modeling and simulation of controlled-release fertilizers. **Journal of Controlled Release**, Estados Unidos, v. 271, n. 10, p. 45-54, 2018.

KOPPEN, W. **Climatologia: com um estudio de los climas de la tierra**. Buenos Aires: Fondo de Cultura Economica, 1948, 495 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA Artes e Textos, 2006, 532 p.

NAVROSKI, M. C.; TONETT, E. L.; MAZZO, M. V.; FRIGOTTO, T.; PEREIRA, M. O.; GALVANI, L. V. Procedência e adubação no crescimento inicial de mudas de cedro. **Pesquisa florestal brasileira**, Colombo, v. 36, n. 85, p. 17-24, 2016.

OHASHI, S. T.; YARED, J. A. G.; NETO, J. T. F. Variabilidade entre procedências de paricá *Schizolobium parahyba* var *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby plantadas no município de Colares-Pará. **Acta Amazônica**, Pará, v. 40, n. 1, p. 81-88, 2010.

RESENDE, L. C.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Diversity and genetic connectivity among populations of a threatened tree (*Dalbergia nigra*) in a recently fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. **Genética**, v. 139, n. 9, p. 1159-1168, 2011.

ROSA, T. L. M.; JORDAIM, R. B.; ALEXANDRE, R. S.; ARAÚJO, C. P.; GONÇALVES, F. G.; LOPES, J. C. Controlled release fertilizer in the growth of *Moringa oleifera* LAM. seedlings. **Floresta**, Curitiba, v. 48, n. 3, p. 303-310, 2018.

ROSSA, Ü. B.; ANGELO, A. C.; WESTPHALEN, D. J.; DE OLIVEIRA, F. E. M.; DA SILVA, F. F.; DE ARAUJO, J. C. Fertilizante de liberação lenta no desenvolvimento de mudas de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (angico-vermelho) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 4, p. 841-852, 2015.

SAMPAIO, P. T. B.; RESENDE, M. D. V.; ARAÚJO, A. J. Estimativas de parâmetros genéticos e métodos de seleção para o melhoramento genético de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 2243-2253, 2000.

SERRANO, L. A. L.; MARINATO, F. A.; MAGIERO, M.; STURM, G. M. Produção de mudas de pimenteira-do-reino em substrato comercial fertilizado com adubo de liberação lenta. **Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 4, p. 512-517, 2012.

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

**CAPÍTULO II – PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Dalbergia nigra* POR ESTAQUIA E
MINIESTAQUIA**

RESUMO

SANTOS, Aline Ramalho dos. **Propagação vegetativa de *Dalbergia nigra* por estaquia e miniestaquia**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elzimar de Oliveira Gonçalves.

O método de propagação usual da *Dalbergia nigra*, é via seminal. Entretanto, a oferta sazonal, com quantidade de sementes variável, limita a produção contínua de mudas para implantação de povoamentos. Desta forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial da estaquia e miniestaquia como método de propagação vegetativa para a *D. nigra*. Foram realizadas treze coletas de brotações para análises da sobrevivência e produtividade das minicepas. O material vegetativo utilizado na pesquisa foi coletado de plantas juvenis do minijardim clonal. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 2 x 4, testando-se duas procedências geográficas, duas doses de FLC e quatro concentrações de AIB (0 mg Kg⁻¹; 2.000 mg Kg⁻¹; 4.000 mg Kg⁻¹ e 6.000 mg Kg⁻¹), com quatro repetições, para miniestacas apicais, bem como intermediárias. Para obtenção do enraizamento das estacas de material adulto, foram retirados ramos de quatro árvores matrizes com 5 anos de idade. O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 2 x 5, testando-se duas posições de miniestacas (apical e intermediária) e cinco concentrações de AIB (0 mg Kg⁻¹; 2.000 mg Kg⁻¹; 4.000 mg Kg⁻¹; 6.000 mg Kg⁻¹ e 8.000 mg Kg⁻¹), com quatro repetições. As avaliações de velocidade de enraizamento das miniestacas foram realizadas diariamente, a partir da data de estaqueamento até 60º dia, para cálculo do tempo médio de enraizamento de miniestacas (TMER). Após 60 dias em casa de vegetação foi analisada a porcentagem de sobrevivência (%S), porcentagem de enraizamento (%E), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes por miniestaca (NR), números de brotos (NB), vigor das miniestacas (VIG), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST). As avaliações do efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas *D. nigra* foram realizadas somente em miniestacas apicais e intermediárias, uma vez que 60 dias após estaqueamento do material adulto não havia sobrevivência. O minijardim

clonal de *D. nigra* obteve 100% de sobrevivência, apresentando potencial quanto à multiplicação vegetativa das minicepas, permitindo coletas sucessivas de brotações juvenis. A utilização de AIB em miniestacas de *D. nigra* não é um condicionante para o enraizamento, embora a adição de 6.000 mg Kg⁻¹ AIB promoveram maior CR, NR, VIG e MSR de miniestacas apicais, já para miniestacas intermediárias a adição de 6.000 mg Kg⁻¹ de AIB antecipou o TMER e proporcionou maior NR adventícias. Entretanto, as concentrações de AIB reduziram linearmente a emissão de BR, MSPA e MST. O teor nutricional da planta matriz influenciou no enraizamento de miniestacas, sendo a procedência de Linhares mais responsiva a adição de FLC. As procedências geográficas apresentaram um conjunto de respostas e comportamento diferencial no enraizamento. As estacas de material adulto apresentaram elevada mortalidade e ausência de enraizamento. A miniestaquia, utilizando material juvenil, mostrou-se tecnicamente viável como forma de propagação de *D. nigra*, sendo possível usar esta metodologia para produção de mudas em larga escala.

Palavras-chave: ácido indol-3-butírico, enraizamento adventício; produção de mudas, silvicultura clonal.

ABSTRACT

SANTOS, Aline Ramalho dos. **Vegetative propagation of *Dalbergia nigra* by cutting and minicuttings technique**. 2019. Dissertation (Master of Forest Science) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Prof^a. Dr^a. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Co-adviser: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda.

The usual method of propagation of *Dalbergia nigra*, is via seminal. However, the seasonal supply, with variable seed quantity, limits the continuous production of seedlings for the implantation of stands. In this way, the objective of this work was to evaluate the potential of cuttings and minicuttings technique as a vegetative propagation method for *D. nigra*. Thirteen collections of shoots were performed to analyze the survival and productivity of the ministumps. The vegetative material used in the research was collected from juvenile plants of the minijardim garden. The experiment was conducted in a completely randomized design (DIC), in a 2 x 2 x 4 factorial scheme, by testing two geographical provenances, two FLC doses and four IBA concentrations (0 mg kg⁻¹; 2,000 mg kg⁻¹; 4,000 mg Kg⁻¹ and 6,000 mg Kg⁻¹), with four replicates, for apical minicuttings as well as intermediates. In order to obtain the rooting of the cuttings of adult material, branches were removed from four 5-year-old parent trees. The experiment was carried out in a 2 x 5 factorial DIC, with two mini-incision positions (apical and intermediate) and five IBA concentrations (0 mg kg⁻¹; 2,000 mg kg⁻¹; 4,000 mg kg⁻¹; 6,000 mg Kg⁻¹ and 8,000 mg Kg⁻¹), with four replicates. The rooting speed assessments of minicuttings were performed daily, from the date of staking to 60^o day, to calculate the mean time of minicut rooting (TMER). After 60 days in the greenhouse, the percentage of survival (% S), rooting percentage (% E), length of the largest root (CR), number of roots per minicut (NR), number of shoots vigor of minicuttings (VIG), dry shoot mass (MSPA), root dry mass (MSR) and total dry mass (MST). Evaluations of the effect of IBA application on the rooting of *D. nigra* minicuttings were performed only in apical and intermediate minicuttings, since 60 days after staking of adult material there was no survival. The miniclonal garden of *D. nigra* obtained 100% survival, presenting potential for the vegetative multiplication of the ministumps, allowing successive collections of juvenile shoots. The use of IBA in minicuttings of *D. nigra* is not

a conditioner for rooting, although the addition of 6,000 mg Kg⁻¹ IBA promoted higher CR, NR, VIG and MSR of apical minicuttings, while for mini-skips the addition of 6,000 mg Kg⁻¹ of IBA anticipated TMER and provided higher adventitious NR. However, the IBA concentrations linearly reduced the emission of BR, MSPA and MST. The nutritional content of the matrix plant influenced the rooting of minicuttings, with the Linhares origin being more responsive to the addition of FLC. The geographical origins presented a set of responses and differential behavior in rooting. The cuttings of adult material presented high mortality and no rooting. The minicutting, using juvenile material, proved to be technically viable as a form of propagation of *D. nigra*, being possible to use this methodology for large-scale seedling production.

Keywords: indole-3-butyric acid, adventitious rooting; production of seedlings, clonal forestry.

1. INTRODUÇÃO

Dalbergia nigra (Vell.) Fr. All. ex Benth. (Fabaceae – Papilionoideae), popularmente conhecida como jacarandá-da-bahia ou jacarandá-caviúna, é uma espécie arbórea endêmica, encontrada nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e de São Paulo, na Floresta Pluvial Atlântica (CARVALHO, 2003; LIMA, 2015). Na escala sucessional de uma floresta é classificada como secundária tardia, sendo raramente encontrada em regeneração natural. Sua madeira possui beleza natural, qualidade e propriedades tecnológicas excelentes, considerada uma das mais valiosas espécies madeireiras que ocorrem no Brasil, sendo objeto de exportação desde os tempos coloniais (CARVALHO, 2003).

Devido à intensa exploração e degradação do seu ambiente natural, 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. A preocupação com a obrigatoriedade de restauração florestal e as pressões ambientais em relação à perda de material genético de grande valor e importância econômica e ecológica, têm conduzido ao estudo de espécies nativas (DIAS et al., 2015).

A *D. nigra* têm sua forma de propagação comumente realizada por sementes, porém, o uso dessa técnica limita a produção comercial de mudas, visto que a espécie apresenta uma floração supra-anual, isto é, a periodicidade de produção de sementes é irregular, ocorrendo anos com intensa produção, seguido por anos de baixa ou nenhuma reprodução (CARVALHO, 2003).

A propagação vegetativa ou assexuada da *D. nigra* vêm ao encontro da superação das dificuldades da propagação semínifera, possibilitando assim auxiliar no resgate e conservação de recursos genéticos florestais (DIAS et al., 2012), bem como, base para silvicultura clonal para possíveis fins de proteção e, ou comercial de madeiras nobres. Entre as técnicas de propagação vegetativa, a miniestaquia vem sendo utilizada com sucesso na maximização da produção clonal em *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2009), podendo ser viável para propagar espécies nativas.

Vários autores afirmam que o potencial rizogênico ou habilidade de formação de raízes difere consideravelmente entre as espécies arbóreas, podendo, ser influenciado

por fatores, como, balanço hormonal, tipo/posição da estacas, genótipo, fatores ambientais, sanidade das estacas, grau de juvenildade do material, condições fisiológicas e nutricionais da planta matriz doadora de propágulos (ALFENAS et al., 2009; HARTAMANN et al., 2011; XAVIER et al., 2013).

No entanto, existem alguns fatores que podem maximizar a eficácia da miniestaquia, a exemplo, o uso de reguladores de crescimento, que podem aumentar o enraizamento de propágulos vegetativos, sendo o ácido indol-3-butírico (AIB) o mais utilizado (SAUER et al., 2013). O manejo nutricional do minijardim clonal, também é apontado por Cunha et al. (2008); Alfenas et al. (2009) e Xavier et al. (2013) como um dos fatores de maior relevância na produção massal de propágulos vegetativos. Além deste, estudos de enraizamento de espécies de diferentes procedências vem revelando a existência de variações genéticas entre as diferentes origens geográficas sobre o potencial de enraizamento de estacas (KALIL FILHO; HOFFMANN; WENDLING, 2007).

Apesar do grande valor ambiental e potencial madeireiro da *D. nigra*, são escassas as informações sobre sua silvicultura. Assim, estudos que tratam formas e estratégias de propagação da espécie devem ser investigados com urgência. Para a aplicação desta técnica em espécies ainda não domesticadas surgem alguns pontos que precisam ser analisadas com rigor científico, como: A nutrição das minicepas exerce influência na produtividade e conseqüente enraizamento de miniestacas de *D. nigra*? Existe variação entre as procedências geográficas quanto ao percentual e qualidade de enraizamento? O uso de reguladores de crescimento potencializam o enraizamento? Existe influência da posição de coleta dos propágulos no enraizamento? A técnica de estaquia e miniestaquia, como forma de propagação assexuada da espécie arbórea nativa *D. nigra*, é um método viável tecnicamente para a produção de mudas?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial da estaquia e miniestaquia como método de propagação vegetativa para a *D. nigra*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade produtiva da miniestaquia através da produção e sobrevivência das minicepas nas sucessivas coletas;
- Avaliar a relação entre nutrição de minicepas e o enraizamento de miniestacas de *D. nigra* provenientes de mudas de diferentes procedências geográficas;
- Avaliar a sobrevivência, enraizamento e vigor das miniestacas sob concentrações crescentes de ácido indol-3-butírico (AIB);
- Verificar a influência da posição de coleta dos propágulos no enraizamento;
- Verificar a concentração de AIB mais adequada para o enraizamento;
- Verificar a viabilidade de produzir mudas por meio da propagação assexuada, através da técnica de estaquia e miniestaquia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das matrizes

As etapas metodológicas de produção das matrizes para implantação do minijardim clonal estão descritas no Capítulo I “Fertilizante de liberação controlada no crescimento de mudas de *D. nigra*”. Foram utilizadas mudas selecionadas, produzidas dos tratamentos de 4,0 e 8,0 g dm³ de FLC Basacote® Mini 6M, com formulação 13-6-16 e tempo de liberação de 5 a 6 meses, por estas apresentaram o maior crescimento, consistindo nos dois tratamentos de fertilização.

3.2 Estabelecimento e manejo do minijardim clonal

Conforme a técnica de miniestaquia descrita em Xavier e Wendling (1998), o minijardim clonal foi constituído de minicepas, obtidas pela propagação via seminal das procedências geográficas de *D. nigra*.

Aos 120 dias após a semeadura, 150 mudas, de cada procedência, e de cada dose, foram transplantadas para vasos de polietileno com capacidade volumétrica de 3,8 L, com diâmetro superior de 15,5 cm, inferior 10 cm e altura de 24 cm, previamente adubadas com fertilizante de liberação controlada (4,0 e 8,0 g dm⁻³ do FLC Basacote® Mini 6M, com formulação 13-6-16 e tempo de liberação de 5 a 6 meses), alocados em canteiros suspensos a 1 m de altura, sob cobertura com plástico transparente de polietileno.

Ao atingirem altura de 30 cm, as mudas foram quebradas na parte apical, a uma altura de 20 cm da base, visando estimular a ocorrência de brotações laterais, sem cessar o processo de fotossíntese. Estas, foram podadas com tesouras de podas, em intervalos de 7 dias ou mais, dependendo do desenvolvimento, para dar a conformação do tipo taça a minicepa, na qual foi observada 55 dias após a primeira poda.

O manejo do minijardim seminal foi feito com irrigações de gotejamento diárias, com vazão de 0,1 litros por 2 minutos, 3 vezes ao dia, visando manter a turgescência adequada para produção de material vegetativo (miniestacas).

3.3 Experimento I - Obtenção e enraizamento das miniestacas de material juvenil

As miniestacas apicais e intermediárias foram coletadas da décima sexta poda do minijardim clonal, no mês de agosto de 2018. Estas foram acondicionadas em caixas de isopor contendo água, visando manter as condições de vigor, turgescência do material vegetativo e boas condições fisiológicas, em um intervalo de tempo de até 30 minutos. Estas foram preparadas com tamanho de 6 cm de comprimento, contendo dois pares de folhas, reduzidas à um terço de sua dimensão original, visando minimizar perdas de água por transpiração e o efeito “guarda-chuva” (recurvamento das folhas). As miniestacas denominadas intermediárias foram obtidas da porção intermediária do ramo que deu origem a miniestaca apical.

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

Posteriormente, estas tiveram suas bases imersas em solução de AIB em pó, com talco inerte como veículo, a 1,5 cm, com tempo de contato de 5 segundos, nas diferentes concentrações e, em seguida, estaqueadas em tubetes de 55 cm³ de capacidade, contendo substrato comercial (casca de *Pinus*, vermiculita, resíduo orgânico agroindustrial classe A, serragem de madeira, esterco – camas de equinos, NPK).

Para a preparação do AIB em talco, este foi dissolvido em álcool etílico absoluto e depois misturado com o talco. A mistura foi seca a temperatura ambiente e homogeneizada antes do uso.

O estaqueamento foi realizado em casa de vegetação com telado de sombrite de 20%, com temperatura entre 25 e 30°C e umidade controlada. A umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação foi mantida acima de 80%, por meio de um sistema de nebulização intermitente, formado por 60 bicos nebulizadores, espaçados a cada 50 cm. 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 Benomyl (1 g L⁻¹) e Captan (1 g L⁻¹), em aplicações alternadas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 2 x 4, testando-se duas procedências geográficas, duas doses de fertilizante de liberação controlada (4 e 8,0 g dm⁻³) e quatro concentrações de AIB (0 mg Kg⁻¹; 2.000 mg Kg⁻¹; 4.000 mg Kg⁻¹ e 6.000 mg Kg⁻¹), com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por 13 miniestacas, totalizando 832 miniestacas para apicais, bem como intermediárias.

3. 4 Experimento II - Obtenção e enraizamento das estacas de material adulto

Os ramos para a confecção das estacas foram retirados de quatro árvores matrizes de *D. nigra* com 5 anos de idade, localizadas 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), localizado no município de Jerônimo Monteiro – ES, apresentando latitude de 20° 47'S e longitude de 41° 24'W e altitude de 120 m.

Para a seleção das árvores doadoras de estacas atentou-se para que as mesmas estivessem livres de sintomas visuais como desfolha, descoloração ou deformação das folhas, uma vez que esses distúrbios podem interferir no processo de enraizamento.

Para tanto, as estacas foram obtidas de brotações de copa, coletadas no mês de julho de 2018, confeccionadas com tamanho de 6 cm de comprimento, contendo de dois pares de folhas, reduzidas à um terço de sua dimensão original. Em seguida, foram desinfestadas, imersas em solução de AIB, e inseridas em tubetes (55 cm³) preenchidos com substrato comercial e dispostas em casa de vegetação para o enraizamento.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 5, testando-se duas posições de estacas (apical e intermediária) e cinco concentrações de AIB (0 mg Kg⁻¹; 2.000 mg Kg⁻¹; 4.000 mg Kg⁻¹; 6.000 mg Kg⁻¹ e 8.000 mg Kg⁻¹), com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por 10 miniestacas, totalizando 400 miniestacas.

3.5 Avaliações experimentais

3.5.1 Sobrevivência e produção das minicepas

A cada sete dias, época determinada em função da existência de brotações com tamanho mínimo (duas gemas e aproximadamente 6 cm de comprimento) para a confecção de miniestacas, foram realizadas as avaliações de sobrevivência (SM) e produtividade das minicepas por m² (PM), em função de 13 podas sucessivas, durante o período de 4 meses (fevereiro a maio de 2018). Para tanto, foram utilizadas o delineamento experimental inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 2 x 4, com quatro repetições de 15 minicepas cada, sendo estudadas duas procedências de *D. nigra* (Viçosa, MG e Linhares, ES), duas doses de fertilizante de liberação controlada (4,0 e 8,0 kg m⁻³) em função dos meses de coletas de miniestacas (fevereiro, março, abril e maio).

Os dados foram submetidos à análise de variância e ao verificar diferenças significativas, pelo teste F a 5%, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico R Development Core Team (2011), versão 3.2.0.

3.5.2 Efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas

As avaliações de velocidade de enraizamento das miniestacas foram realizadas diariamente, a partir da data de estaqueamento até 60º dia, onde foram observadas a porcentagem de miniestacas com raízes na extremidade inferior do tubete (MELO, 2011), para a realização do cálculo do tempo médio de enraizamento de miniestacas (TMER), segundo metodologia proposta por Labouriau (1983).

O tempo de permanência das miniestacas em casa de vegetação foi de 60 dias, sendo realizadas, ao final deste período, avaliações referentes à porcentagem de sobrevivência (%S), porcentagem de enraizamento (%E), comprimento da maior raiz (CR, cm planta⁻¹), número de raízes por miniestaca (NR, unidade), números de brotos (NR, unidade), vigor das miniestacas (VIG), massa seca da parte aérea (MSPA, g planta⁻¹), massa seca da raiz (MSR, g planta⁻¹) e massa seca total (MST, g planta⁻¹).

Para efeito das avaliações, foi quantificado o número de plantas vivas e a taxa de sobrevivência, conforme descrito por Batista et al. (2014).

$$S\% = \left(\frac{V}{P}\right) * 100$$

em que:

S% = porcentagem de sobrevivência;

V = número de plantas vivas;

P = número de plantas estaqueadas no experimento.

Foram consideradas enraizadas as miniestacas com raízes maiores ou iguais a 0,5 cm e vivas, sendo contabilizado o número de miniestacas enraizadas em relação às miniestacas vivas (BATISTA, et al. 2014). Para a contagem do número de raízes, foram consideradas as raízes emitidas diretamente da base das miniestacas.

$$E\% = \left(\frac{e}{S}\right) * 100$$

em que:

E% = porcentagem de enraizamento;

e = número de plantas com raiz;

S = número de plantas vivas na saída da casa de vegetação.

Para determinação da massa seca da parte aérea (MSPA, g planta⁻¹) e massa seca de raízes (MSR, g planta⁻¹), 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 planta⁻¹). Em seguida, o material foi acondicionado em sacos de papel e colocados 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 à soma da MSPA e MSR.

As avaliações de vigor das miniestacas foram realizadas de acordo com uma escala de notas, em que: 0 = péssimo: miniestacas vivas sem emissão de raiz, ou com presença de calos, sem crescimento de brotações axilares; 1 = ruim: miniestacas vivas sem emissão de raiz e com crescimento de brotações axilares; 2 = regular: miniestacas sem brotações e comprimento da raiz maior inferior a 10 cm de comprimento; 3 = bom:

miniestacas com brotações e raiz maior inferior a 10 cm; 4 = ótimo: miniestacas sem brotações e comprimento da maior raiz superior a 10 cm; 5= excelente: miniestacas com brotações e comprimento da maior raiz superior a 10 cm. Para quantificação de calos, foram observados na base da miniestaca a presença de estruturas arredondadas e esbranquiçadas indicando a existência de calos.

Os dados foram submetidos ao teste de verificação de pressuposição de normalidade (Shapiro Wilk). A variável E (%) para as miniestacas intermediárias apresentou os resultados de p-valor abaixo de 0,05, não possuindo suas distribuições normais dos resíduos, o que levou à transformação dos dados com uso da função $Y = \text{raiz}(x + 1)$, entretanto, apresentados na versão original. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância e ao verificar diferenças significativas, pelo teste F a 5%, as médias dos fatores qualitativos (procedência e dose de FLC) foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% e 1% de probabilidade e as médias do fator quantitativo (concentração de AIB) foram submetidas à análise de regressão a fim de verificar a concentração ótima do AIB 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 estatístico R Development Core Team (2011), versão 3.2.0.

As avaliações do efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas *D. nigra* foram realizadas somente em miniestacas apicais e intermediárias, uma vez que 60 dias após estaqueamento do material adulto não havia sobrevivência.

4. RESULTADOS

4.1 Sobrevivência e produtividade de minicepas (PM)

Verificou-se 100% de sobrevivência das minicepas nas 13 sucessivas coletas de miniestacas de *D. nigra*.

Houve interação ($p \leq 0,05$) entre os fatores doses de FLC e procedências de *D. nigra* para a variável PM, onde é possível observar que a combinação 8 kg m⁻³ de FLC para procedência ES apresentou maior produtividade mensal (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Desdobramento da interação entre os fatores doses de fertilizante de liberação controlada (FLC) e procedências geográficas para a produtividade de minicepas (PM) por m², de *D. nigra*.

FLC (kg m ⁻³)	PM (miniestacas/ m ² / mês)	
	Procedências	
	Viçosa (MG)	Linhares (ES)
4	411,12 Aa	433,8 Ba
8	384,84 Ab	628,92 Aa

Médias seguidas de letras minúsculas e maiúsculas iguais na linha e coluna, respectivamente, não diferenciam estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Houve efeito individual para o fator meses de coletas para PM de *D. nigra*, onde o número de miniestacas produzidas foi significativamente superior para as coletas realizadas nos meses de abril e maio (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Médias da produtividade de minicepas de *D. nigra* por m², em função dos meses de coletas.

Meses	PM (miniestacas/ m ² / mês)
Fev	62,28 c
Mar	404,28 b
Abr	686,88 a
Mai	705,60 a

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

Com relação ao número de miniestacas por m² por mês, observou-se aumento gradativo da produtividade de miniestacas do primeiro até o terceiro mês, com posterior estabilização.

4.2 Enraizamento de miniestacas apicais

De acordo com os resultados na análise de variância (Tabela 2.3), verifica-se que houve interação ($p \leq 0,05$) entre os fatores doses de FLC e procedências de *D. nigra* para a variável MSR, assim como dos fatores procedências e concentrações de AIB para o CR, NR, VIG e MSPA, indicando que a ação conjunta dos fatores influenciaram na expressão dessas variáveis.

Tabela 2.3 - Análise de variância para as variáveis de crescimento do sistema radicular de miniestacas apicais de duas procedências geográficas de *D. nigra* submetidas a diferentes doses de fertilizantes de liberação controlada e concentrações de ácido indol-3-butírico, aos 60 dias após estaqueamento.

FV	GL	Quadrados Médios				
		TMER (dias)	S (%)	E (%)	CR (cm planta ⁻¹)	NR (un.)
DOSE (D)	1	83,01943 ^{**}	0,924554 ^{ns}	175,184350 ^{ns}	0,07439 ^{ns}	0,30180 ^{ns}
PROC (P)	1	11,22267 ^{ns}	2404,770314 ^{**}	63,158902 ^{ns}	3,35943 ^{ns}	6,27584 ^{ns}
AIB (A)	3	18,10298 ^{ns}	114,336739 ^{ns}	330,313648 [*]	2,25688 ^{ns}	29,68062 ^{**}
D x P	1	15,70378 ^{ns}	577,847439 ^{ns}	233,781577 ^{ns}	0,03243 ^{ns}	1,62789 ^{ns}
D x A	3	7,18206 ^{ns}	8,321005 ^{ns}	50,761496 ^{ns}	0,40466 ^{ns}	1,13264 ^{ns}
P x A	3	6,13909 ^{ns}	143,922578 ^{ns}	221,650260 ^{ns}	2,51316 [*]	8,28299 [*]
D x P x A	3	19,58837 ^{ns}	166,111918 ^{ns}	262,573552 ^{ns}	1,72062 ^{ns}	0,48783 ^{ns}
Resíduo	48	9,99598	171,042894	96,529361	0,88599	2,31294
CV %		7,33	17,30	11,65	8,70	20,94

FV	GL	Quadrados Médios				
		BR (un.)	VIG	MSPA (g planta ⁻¹)	MSR (g planta ⁻¹)	MST (g planta ⁻¹)
DOSE (D)	1	0,00566 ^{ns}	0,10930 ^{ns}	0,00075 ^{ns}	0,00029 ^{ns}	0,00197 ^{ns}
PROC (P)	1	0,03697 ^{ns}	0,26069 ^{ns}	0,00315 [*]	0,00013 ^{ns}	0,00200 ^{ns}
AIB (A)	3	0,03318 ^{ns}	0,37474 ^{ns}	0,00104 ^{ns}	0,00056 ^{**}	0,00027 ^{ns}
D x P	1	0,02191 ^{ns}	0,05375 ^{ns}	0,00038 ^{ns}	0,00072 [*]	0,00216 ^{ns}
D x A	3	0,01520 ^{ns}	0,32376 ^{ns}	0,00116 ^{ns}	0,00018 ^{ns}	0,00214 ^{ns}
P x A	3	0,09061 ^{ns}	0,63068 ^{**}	0,00142 ^{**}	0,00012 ^{ns}	0,00220 ^{ns}
D x P x A	3	0,00404 ^{ns}	0,20070 ^{ns}	0,00048 ^{ns}	0,00003 ^{ns}	0,00040 ^{ns}
Resíduo	48	0,04667	0,13915	0,00049	0,00012	0,00083
CV %		16,72	8,60	23,26	28,78	21,56

V: fonte de variação; GL: graus de liberdade; CV%: coeficiente de variação; TMER: tempo médio de emissão de raízes na extremidade inferior do tubete; S: sobrevivência; E: enraizamento; CR: comprimento da raiz; NR: número de raiz; BR: brotações; VIG: vigor; MSPA: massa seca da parte aérea; MSR: massa seca da raiz; MST: massa seca total. * e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente; ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F. D: Dose de fertilizante de liberação controlada; P: Procedência; A: Ácido indol-3-butírico.

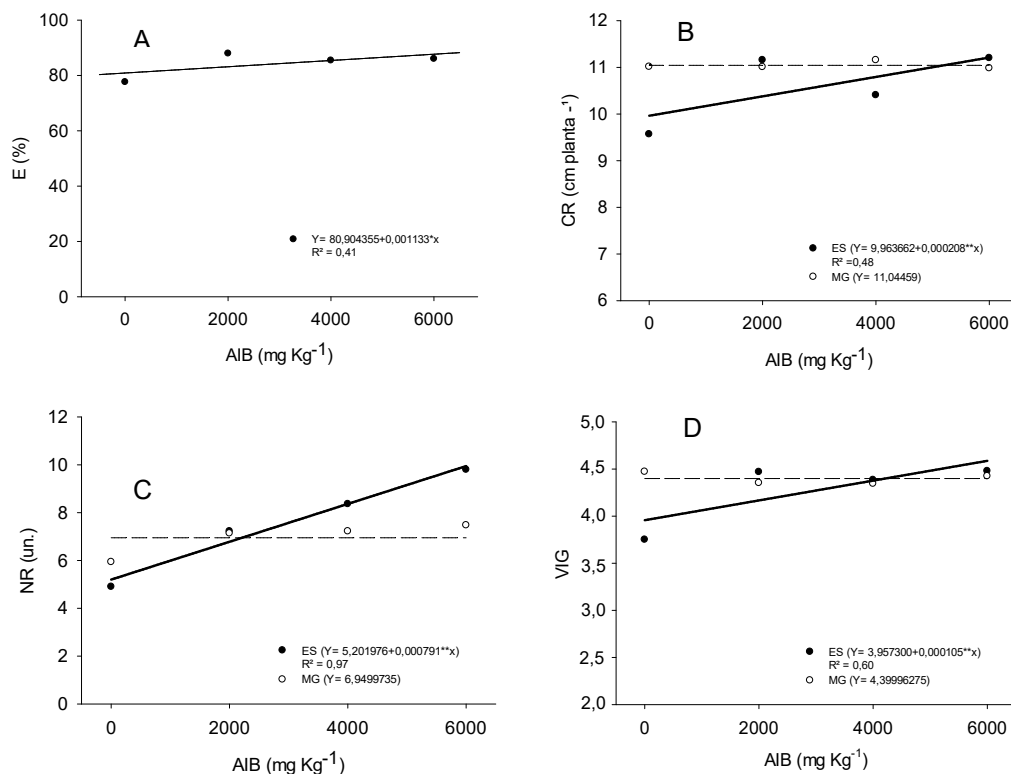
Houve efeito isolado para o fator doses de FLC para o TMER, onde as miniestacas de *D. nigra* produzidas na dose 8,0 kg m⁻³ apresentaram o menor tempo de emissão das raízes na extremidade inferior do tubete, com 41,86 dias, quando comparadas à dose 4 kg m⁻³, com 44,27 dias.

Verificou-se o efeito isolado para o fator procedências geográficas para a variável S (%), com resultados superiores para as miniestacas de Viçosa, MG (81,73%), em relação a Linhares, ES (69, 47%).

As doses de AIB influenciaram positivamente o E (%), onde o valor máximo de enraizamento (87,98%) foi observado na dose 6.000 mg Kg⁻¹, com tendência de crescimento linear crescente (Figura 3.1A).

Houve interação ($p \leq 0,05$) entre as procedências e concentrações de AIB para as variáveis CR, NR e VIG, em que as miniestacas de *D. nigra* providas de Linhares apresentaram o valor máximo de 11,21 cm planta⁻¹, 9,94 raízes e 4,58, respectivamente, alcançados na concentração 6.000 mg Kg⁻¹, com tendência de crescimento linear crescente (Figura 3.1B 3.1C, 3.1D). Para as miniestacas da procedência Viçosa, não houve efeito significativo dos modelos de regressão testados (11,04 cm planta⁻¹, 6,94 raízes e 4,39, respectivamente).

Figura 3.1 - (A) porcentagem de enraizamento; (B) comprimento da maior raiz; (C) número de raízes por miniestaca; (D) vigor de miniestacas de *D. nigra* submetidos a diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico, aos 60 dias após estaqueamento. * e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.



Para a MSPA, houve efeito significativo da interação ($p \leq 0,05$) entre as procedências e concentrações de AIB, contudo não houve ajuste dos modelos de regressão testados, a média para miniestacas de procedência de Viçosa corresponde a $0,1024 \text{ g planta}^{-1}$ e para procedência de Linhares de $0,0884 \text{ g planta}^{-1}$.

Houve efeito significativo da interação entre os fatores doses de FLC e procedências para a variável MSR de miniestacas de *D. nigra* (Tabela 2.4), na qual é possível verificar que a combinação 8 kg m^{-3} de FLC para procedência de Linhares apresentou maior incremento.

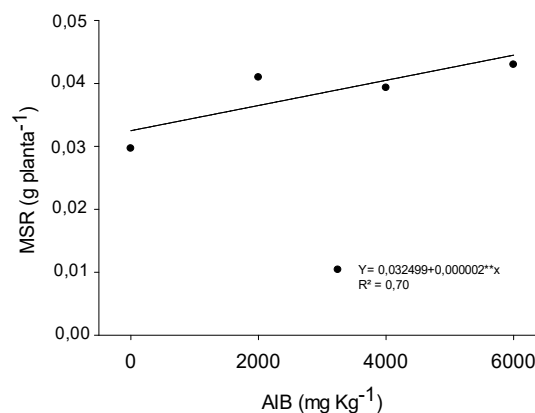
Tabela 2.4 - Desdobramento da interação entre doses de fertilizante de liberação controlada e procedências geográficas para a massa seca da raiz (MSR) de miniestacas de *D. nigra*.

FLC kg m^{-3}	MSR (g planta^{-1})	
	Procedências	
	Viçosa (MG)	Linhares (ES)
4	0,0380 Aa	0,0342 Ba
8	0,0355 Ab	0,0451 Aa

Médias seguidas de letras minúsculas e maiúsculas iguais na linha e coluna, respectivamente, não diferenciam estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Houve ainda, efeito individual para o fator concentrações de AIB para a MSR, onde o valor máximo de incremento ($0,0444 \text{ g planta}^{-1}$) foi observado na dose 6.000 mg Kg^{-1} , com tendência de crescimento linear crescente (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Massa seca da raiz (MSR) de miniestacas de *D. nigra* submetidos a diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico no enraizamento, aos 60 dias após estaqueamento. * significativo a 5% de probabilidade.



4.3 Enraizamento de miniestacas intermediárias

De acordo com os resultados na análise de variância (Tabela 2.5), verifica-se que houve interação ($p \leq 0,05$) entre os fatores doses de FLC e procedências de *D. nigra* para a variável VIG, assim como dos fatores procedências doses de FLC e AIB para o NR, BR, MSPA, MSR e MST e ainda interação das procedências geográficas e AIB para BR, indicando que a ação conjunta dos fatores influenciaram na expressão dessas variáveis.

Tabela 2.5 - Análise de variância para as variáveis de crescimento do sistema radicular de miniestacas intermediárias de duas procedências geográficas de *D. nigra* submetidas a diferentes doses de fertilizantes de liberação controlada e concentrações de ácido indol-3-butírico, aos 60 dias após estaqueamento.

FV	GL	Quadrados Médios				
		TMER (dias)	S (%)	E (%) ¹	CR (cm planta ⁻¹)	NR (un.)
DOSE (D)	1	138,18972 ^{**}	0,924559 ^{ns}	0,51253 ^{ns}	9,79878 ^{**}	0,59863 ^{ns}
PROC (P)	1	67,57806 [*]	208,025092 ^{ns}	0,00042 ^{ns}	20,07936 ^{**}	2,07112 ^{ns}
AIB (A)	3	49,34284 ^{**}	109,405835 ^{ns}	0,09239 ^{ns}	0,53010 ^{ns}	74,51807 ^{**}
D x P	1	10,41103 ^{ns}	74,889033 ^{ns}	0,65208 ^{ns}	0,36903 ^{ns}	16,00230 ^{ns}
D x A	3	5,06665 ^{ns}	97,078399 ^{ns}	0,17984 ^{ns}	0,28498 ^{ns}	31,24318 ^{**}
P x A	3	9,00187 ^{ns}	67,492573 ^{ns}	0,26014 ^{ns}	0,55265 ^{ns}	11,53234 ^{ns}
D x P x A	3	16,42297 ^{ns}	102,009359 ^{ns}	0,03830 ^{ns}	0,23739 ^{ns}	1,88605 ^{ns}
Resíduo	48	9,43557	86,600094	0,23386	0,87782	0,10036
CV %		7,22	10,68	5,02	3,82	8,39

FV	GL	Quadrados Médios				
		BR (un.)	VIG	MSPA (g planta ⁻¹)	MSR (g planta ⁻¹)	MST (g planta ⁻¹)
D	1	0,01999 ^{ns}	0,15496 ^{ns}	0,00312 [*]	0,00119 ^{**}	0,00815 ^{**}
P	1	0,07274 [*]	1,04300 ^{**}	0,01561 ^{**}	0,00297 ^{**}	0,03223 ^{**}
A	3	0,02248 ^{ns}	0,17083 ^{ns}	0,00785 ^{**}	0,00003 ^{ns}	0,00839 ^{**}
D x P	1	0,04069 ^{ns}	0,72301 [*]	0,00060 ^{ns}	0,00001 ^{ns}	0,00079 ^{ns}
D x A	3	0,06694 ^{**}	0,04393 ^{ns}	0,00162 [*]	0,00053 [*]	0,00394 [*]
P x A	3	0,07458 ^{**}	0,04287 ^{ns}	0,00111 ^{ns}	0,00033 ^{ns}	0,00221 ^{ns}
D x P x A	3	0,02305 ^{ns}	0,04795 ^{ns}	0,00001 ^{ns}	0,00006 ^{ns}	0,00003 ^{ns}
Resíduo	48	0,01499	0,11245	0,00056	0,00016	0,00109
CV %		10,45	7,39	15,21	20,31	15,11

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; CV%: coeficiente de variação; TMER: tempo médio de emissão de raízes na extremidade inferior do tubete; S: sobrevivência; E: enraizamento; CR: comprimento da raiz; NR: número de raiz; BR: brotações; VIG: vigor; MSPA: massa seca da parte aérea; MSR massa seca da raiz; MST; massa seca total, * e ** significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente; ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F. T: Dados transformados para $\sqrt{x+1}$. D: Dose de fertilizante de liberação controlada; P: Procedência; A: Ácido indol-3-butírico.

Houve efeito isolado para o fator doses de FLC para as variáveis TMER e CR, das miniestacas de *D. nigra*, com médias superiores para a dose 8 kg m⁻³ (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 - Médias do tempo médio de emissão das raízes (TMER) e do comprimento de raízes (CR) de miniestacas de *D. nigra*, sob diferentes doses de fertilizante de liberação controlada, aos 60 dias estaqueamento.

FLC (kg m ⁻³)	TMER (dias)	CR (cm planta ⁻¹)
4	44,0384 b	10,7290 b
8	41,0996 a	11,5116 a

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

Houve efeito isolado para o fator procedências geográficas para as variáveis TMER, CR, MSPA, MSR e MST de miniestacas de *D. nigra*, com resultados superiores para a procedência de Viçosa, MG (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 - Tempo médio de emissão das raízes (TMER), comprimento de raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) de miniestacas de *D. nigra* de diferentes procedências geográficas, aos 60 dias após estaqueamento.

Procedência	TMER (dias)	CR (cm planta ⁻¹)	MSPA (g planta ⁻¹)	MSR (g planta ⁻¹)	MST (g planta ⁻¹)
Viçosa (MG)	41,5414 a	11,6804 a	0,1716 a	0,0696 a	0,2412 a
Linhares (ES)	43,5966 b	10,5601 b	0,1403 b	0,0560 b	0,1963 b

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

Houve efeito significativo da interação ($p \leq 0,05$) entre os fatores FLC e procedências geográficas para a variável VIG de miniestacas de *D. nigra*, onde a combinação 4 kg m⁻³ de FLC para procedência de Linhares apresentou menor vigor de miniestacas (Tabela 2.8).

Tabela 2.8 - Desdobramento da interação entre os fatores doses de fertilizante de liberação controlada e procedências geográficas para o vigor (VIG) de miniestacas de *D. nigra*, aos 60 dias após estaqueamento.

FLC (kg m ⁻³)	VIG	
	Procedências	
	Viçosa (MG)	Linhares (ES)
4	4,7242 Aa	4,2563 Bb
8	4,6100 Aa	4,5673 Aa

Médias seguidas de letras minúsculas e maiúsculas iguais na linha e coluna, respectivamente, não diferenciam estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Observou-se o efeito individual das concentrações de AIB para o TMER, onde o menor tempo de emissão das raízes na extremidade inferior do tubete (44, 29 dias) foi observado na concentração 6.000 mg Kg^{-1} , com tendência de crescimento linear crescente (Figura 3.3A).

Houve interação ($p \leq 0,05$) entre as doses de FLC e as concentrações de AIB para a variável NR, em que as miniestacas produzidas na dose 4 kg m^{-3} e 8 kg m^{-3} tiveram o valor máximo de 15,65 e 16,04 raízes respectivamente, na concentração 6.000 mg Kg^{-1} , com tendência de crescimento linear crescente (Figura 3.3B).

Para a produção de BR, houve interação ($p \leq 0,05$) entre as doses de FLC e as concentrações de AIB, em que as miniestacas produzidas na dose 4 kg m^{-3} tiveram valor mínimo estimado (1,06 brotos) na concentração 6.000 mg Kg^{-1} , representado por tendência de crescimento linear decrescente, sendo os melhores resultados observados na concentração 0 mg Kg^{-1} (Figura 3.3C). Para as miniestacas produzidas na dose 8 kg m^{-3} de FLC, não houve efeito significativo dos modelos de regressão testados (1,18 brotos).

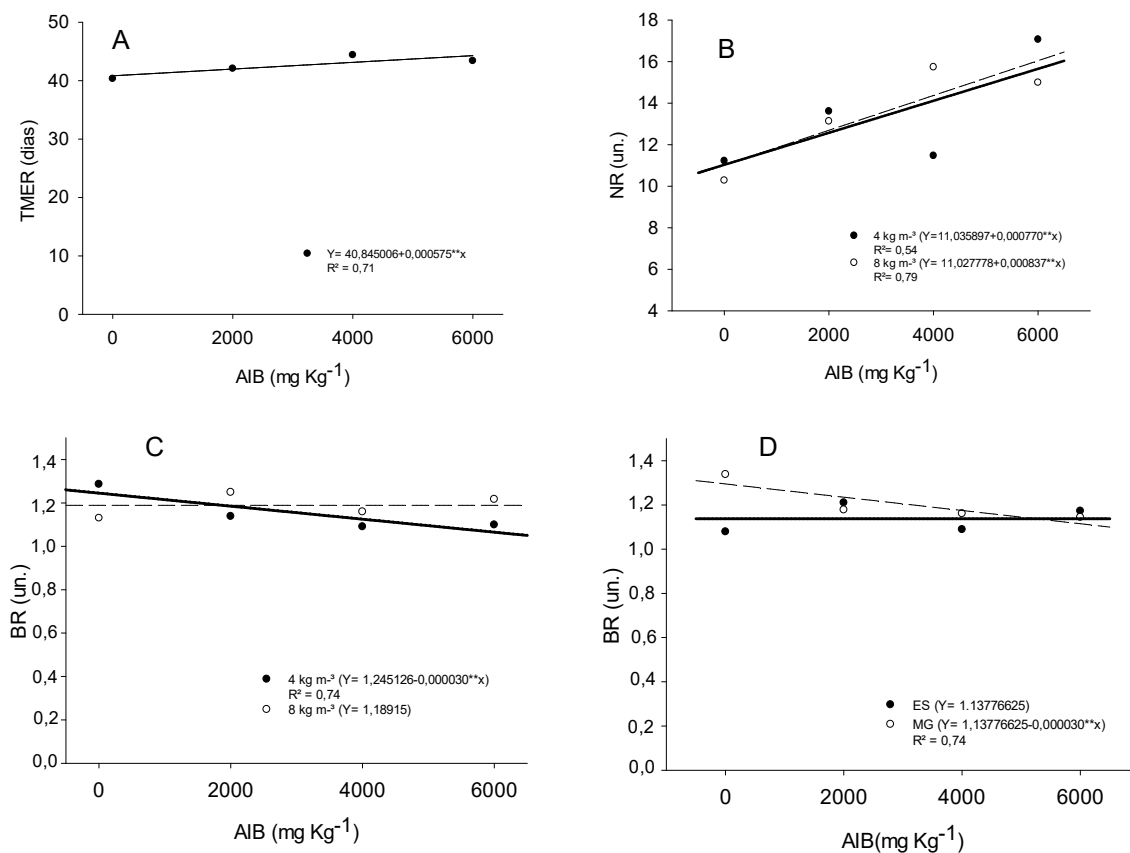
Houve ainda, efeito significativo da interação ($p \leq 0,05$) entre as procedências geográficas e as concentrações de AIB para a variável BR, em que as miniestacas de procedência de Viçosa tiveram valor mínimo estimado (0,95 brotos) na concentração 6.000 mg Kg^{-1} , representado por tendência de crescimento linear decrescente, sendo os melhores resultados observados na concentração 0 mg Kg^{-1} (Figura 3.3D). Não houve significância dos modelos de regressão testados para as miniestacas de procedência de Linhares (1,13 brotos).

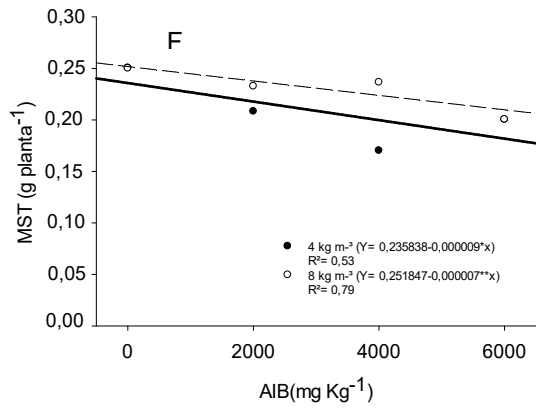
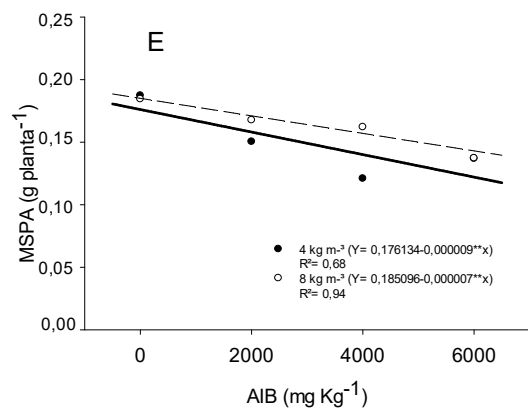
Para a MSPA e MST houve interação ($p \leq 0,05$) entre as doses de FLC e as concentrações de AIB, em que as miniestacas produzidas na dose 4 kg m^{-3} tiveram o valor mínimo de incremento de $0,1221 \text{ g planta}^{-1}$ e $0,1818 \text{ g planta}^{-1}$ respectivamente, na concentração 6.000 mg Kg^{-1} com tendência de crescimento linear decrescente, sendo os melhores resultados observados na concentração 0 mg Kg^{-1} (Figura 3.3E e 3.3F). A dose 8 kg m^{-3} seguiu a mesma tendência, onde o valor mínimo de incremento $0,1430 \text{ g}$ e $0,2098$ respectivamente, foram observados na concentração 6.000 mg Kg^{-1} ,

com tendência de crescimento linear decrescente, sendo os melhores resultados observados na concentração 0 mg Kg⁻¹.

Quanto à produção de MSR, houve efeito significativo da interação ($p \leq 0,05$) entre as doses de FLC e as concentrações de AIB, contudo não houve ajuste dos modelos de regressão testados, sendo a média para miniestacas produzidas na dose 4 kg m⁻³ (0,0585 g) e 8 kg m⁻³ (0,0671g).

Figura 3.3 - (A) tempo médio de emissão das raízes (B) número de raízes por miniestacas; (C) brotações; (D) brotações; (E) massa seca da parte aérea; (F) massa seca total de miniestacas de *D. nigra* 60 dias após estaqueamento. * e ** significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.





5. DISCUSSÃO

5.1 Sobrevivência e produção das minicepas

A alta taxa de sobrevivência das minicepas, ao longo das treze coletas, indicam que o método adotado, quanto à condução do minijardim clonal, é tecnicamente adequado, tendo possibilitado a produção de miniestacas de *D. nigra* em sucessivas coletas, evidenciando a tolerância à poda apical e viabilidade de utilização desse sistema para produção de mudas. As condições de alto vigor (reservas nutricionais adequadas, status hídrico ótimo, sem aparente condição de estresse) fisiológico das miniestacas, resultantes do sistema de manejo adotado no minijardim clonal, constituem fator de grande importância na propagação vegetativa (XAVIER et al., 2013).

Em consonância com os resultados, Oliveira et al. (2015) avaliaram minijardim clonal de ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus*) e observaram 100% de sobrevivência das minicepas após oito coletas de brotações. Pires et al. (2015), avaliando a sazonalidade e solução nutritiva para miniestaquia de *Araucaria angustifolia* observaram que não houve diferença significativa para a sobrevivência das minicepas, apresentando-se 100% vivas no decorrer das onze coletas independentes da solução nutritiva.

Em relação à produção de miniestacas por minicepa, a procedência de Linhares foi mais responsiva a adição de FLC em relação à de Viçosa, indicando possível variabilidade genética entre elas quanto à capacidade e emissão de brotações. Segundo Hartmann et al. (2011) cada material genético pode reagir de maneira diferenciada a propagação vegetativa.

Ensaio com procedências geográficas são de grande valor por possibilitar conhecer e explorar o potencial das procedências em diferentes condições ambientais e para diferentes finalidades (OHASHI; YARED; FARIA NETO, 2010).

Observa-se ainda, ganhos significativos quanto o aspecto de produção de brotações, quando são incorporados ao substrato 8 kg m⁻³ de FLC. A condição nutricional causa alterações fisiológicas na planta-matriz, contribuindo para o acúmulo de reservas, que podem incrementar o crescimento dos propágulos (PAIVA; GOMES, 2011).

Quanto ao aumento gradativo na produção de miniestacas por minicepa a cada nova coleta, este ocorre em função da adaptação das minicepas à quebra de dominância apical após a primeira poda e à reorganização do sistema de crescimento ortotrópico para um sistema plagiotrópico. Desse modo, após a primeira coleta, as gemas dormentes tornaram-se ativas, resultando em maior estímulo ao crescimento (WENDLING; SOUZA JÚNIOR, 2003). Os resultados também indicam a não-exaustão das minicepas com o decorrer das coletas.

5.2 Enraizamento de miniestacas apicais

De modo geral, comprova-se a hipótese de que o teor nutricional da planta matriz influenciou na velocidade de formação das raízes de miniestacas de *D. nigra*, com implicação na MSR. O crescimento acelerado das raízes em função da nutrição da minicepa evidencia que, quanto mais nutrida à planta, maior o número de células produzidas pelos meristemas e mais longo será o eixo de crescimento (DIAS et al., 2012), atingindo assim, em curto espaço de tempo a extremidade inferior do tubete.

O menor tempo de emissão das raízes pode ser atribuído à manutenção do vigor vegetativo da planta matriz ou, correlatamente, a condição nutricional equilibrada do próprio propágulo coletado quanto ao conteúdo de carboidratos, hormônios e outros compostos essenciais à indução radicular, o que explica o fato de propágulos coletados de matrizes cultivadas em soluções nutritivas balanceadas enraizarem melhor do que os produzidos a partir de brotações coletadas diretamente em campo (CUNHA et al., 2009; XAVIER et al., 2013; PIRES et al., 2015).

De acordo com Borges et al. (2011), a utilização do TMER na avaliação do enraizamento de miniestacas possui grande emprego em viveiros florestais, por possibilitar uma indicação prática do momento de se transferirem as mudas para as etapas posteriores do processo de produção.

Observou-se que as concentrações de AIB influenciaram no processo de indução radicular das miniestacas de *D. nigra*, promovendo ganhos expressivos em E (%), CR, NR, VIG e MSR. O uso de regulador vegetal torna ainda maior a probabilidade de emissão de raízes adventícias nos ramos, de modo que a utilização de AIB

proporciona precocidade de enraizamento e da formação das raízes (HARTMANN et al., 2011).

A emissão de um maior número de raízes, aumento uniforme do enraizamento e incremento do sistema radicular em plantas de *D. nigra* é fundamental para a expansão da área de solo a ser explorada, favorecendo a aquisição de água e nutrientes (NAVROSKI et al., 2010). Fatores que podem ser úteis em povoamentos florestais e programas de recuperação de áreas degradadas, visto que para estas condições, as mudas necessitam de um sistema radicular robusto para resistir às condições de estresse nestes ambientes.

De acordo com Sampaio et al. (2010) mudas vigorosas, com sistema radicular mais desenvolvido, apresentam maior probabilidade de sobreviver e crescer mais rápido em condições adversas de campo.

Trabalhando com ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus*), Oliveira et al., (2015) avaliaram a viabilidade da técnica da propagação vegetativa via miniestaquia testando o AIB nas doses de 0, 2.000, 4.000, 6.000 e 8.000 mg L⁻¹, em propágulos obtidos em diferentes posições na brotação. Concluíram que o AIB não foi necessário para o enraizamento das miniestacas, entretanto, sua utilização na dose de 8.000 mg L⁻¹ promoveu incremento do número e comprimento de raízes. Para a produção de miniestacas de pitangueira (*Eugenia uniflora*), Peña Peña et al. (2015) verificaram que o enraizamento é favorecido com o uso de AIB em concentrações próximas de 2.500 mg L⁻¹.

Essa tendência foi observada também por Lima et al. (2018), onde constataram que o uso de AIB potencializou a taxa de enraizamento e melhorou o sistema radicular das estacas em relação ao número e comprimento de raízes para *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*, nas concentrações entre 2.000 e 3.000 ppm.

Neste trabalho, observou-se ainda diferença entre as procedências geográficas quanto à sobrevivência das miniestacas *D. nigra*. Lima et al. (2018) destacam, que mesmo sendo de uma mesma espécie, em cada localidade de desenvolvimento da planta-mãe, as sementes estão sujeitas a variações de qualidade fisiológica devido a variabilidade genética e adaptação edafoclimática das procedências, acarretando manifestações diferentes daquelas que seriam obtidas no seu local de origem.

Portanto, várias são as respostas das espécies as adaptações aos diferentes habitats, podendo ocorrer variações de tolerância dentro da mesma espécie, o que caracteriza a plasticidade fenotípica da mesma. Tal adaptação é referida como sendo capacidade em expressar diferenças morfológicas, anatômicas, fisiológicas e comportamentais em resposta ao ambiente (SCHLICHTING, 1986; WEST-EBERHARD, 1989; VIA, 1994; HOLT, 1995).

5.3 Enraizamento de miniestacas intermediárias

Os resultados obtidos comprovam que a nutrição adequada da planta matriz tem relevância no enraizamento de miniestacas de *D. nigra*, promovendo efeitos altamente significativos no comprimento e na velocidade de formação das raízes.

A nutrição mineral é considerada fator determinante para a predisposição ao enraizamento adventício, tendo em vista a sua participação na determinação de respostas morfogênicas, uma vez que, os macro e micronutrientes estão envolvidos nos processos bioquímicos e fisiológicos vitais da planta (ASSIS et al., 2004; HARTMANN et al., 2011).

Observa-se ainda que a combinação 4 kg m⁻³ de FLC para procedência de Linhares apresentou menor vigor de miniestacas, evidenciando que os materiais genéticos oriundo dessa localidade apresentam maior dependência de adubo, corroborando com os resultados obtidos na fase de crescimento das mudas (Capítulo I).

As variações genéticas existentes entre procedências de uma mesma espécie surgem em decorrência das adaptações das espécies aos diferentes habitats (KAGEYAMA, 1977), e o seu estudo é de fundamental importância para o melhoramento das populações florestais permitindo a produção de sementes de matrizes bem adaptadas, aumento da produtividade das plantações e produção de novos híbridos (FERREIRA; ARAÚJO, 1981).

Sob perspectiva de recuperação de áreas degradadas, a seleção de material genético que melhor se adapte à condição de fertilidade mais baixa do solo tem sido uma preocupação constante, sendo as espécies desejáveis aquelas com maior capacidade de absorver e utilizar os nutrientes (MORAIS et al., 1990). A avaliação da eficiência de utilização dos nutrientes por parte das diferentes espécies florestais,

procedências e, ou, clones é um importante parâmetro para auxiliar o silvicultor no momento de optar pelo material a ser utilizado nos reflorestamentos (CALDEIRA et al., 2002).

Observou-se diferença entre as procedências geográficas quanto ao TMER, CR, MSPA, MSR e MST. A variação observada entre procedências na formação de raízes adventícias pode ter ocorrido em função da diferença do material genético ou, mesmo, devido a diferenças entre níveis endógenos de auxinas na planta. Segundo Mankessi et al. (2009), flutuações na capacidade rizogênica podem ocorrer mesmo entre genótipos estreitamente aparentados, de acordo com determinismo endógeno.

O uso do AIB antecipou o TMER e potencializou a formação de raízes adventícias com relação ao NR, no entanto, observou-se que as concentrações de AIB reduziram linearmente a emissão de BR, MSPA e MST. Fisiologicamente, está ligado a juvenildade do material, com elevado potencial rizogênico natural e balanço hormonal endógeno suficiente para a promoção do enraizamento (DIAS et al., 2012).

As estacas intermediárias por serem menos tenras, apresentam-se mais tolerantes as condições de altas temperaturas e umidade dentro da casa de vegetação, além de maior quantidade de reservas acumuladas, o que lhes proporcionou capacidade de enraizamento. Segundo Azad et al. (2018) a influência do AIB no sucesso do enraizamento é muito específica da espécie. O conteúdo endógeno de auxina pode variar em função da presença de folhas, posição do propágulo, tamanho e diâmetro das miniestacas, podendo a espécie ter uma concentração de AIB diferente para o enraizamento bem-sucedido.

Embora, os resultados demonstrem que as concentrações de AIB foram eficientes para aumentar o comprimento de raiz, número de raízes, vigor de miniestacas, massa seca da parte aérea e menor tempo de emissão das raízes na extremidade inferior do tubete, em termos práticos, poderia se optar pela não utilização do regulador, visto que sua aplicação em miniestacas de *D. nigra* não é um condicionante para o enraizamento. Em termos econômicos, a não utilização, poupa gastos com a aquisição do produto, tempo e mão-de-obra para preparo e aplicação, gerando economia para o produtor.

De modo geral, observou-se aptidão de *D. nigra* à miniestaquia como método de propagação vegetativa, a partir de matrizes de origem seminal, podendo assim, ser uma técnica viável para superação das dificuldades de produção de mudas dessa espécie via sementes, como na obtenção de material vegetativo com grau de juvenilidade, floração supra-anual, produção irregular de sementes e heterogeneidade do material seminífero.

5.4 Enraizamento de estacas de material adulto

Observou-se que não houve sobrevivência de estacas de *D. nigra* proveniente de plantas matrizes adultas, indicando que o método apresenta limitações para a propagação vegetativa da espécie.

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 à maior idade ontogenética (DIAS et al., 2012).

As plantas lenhosas experimentam mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas à medida que passam por sucessivas fases de desenvolvimento (fase juvenil, de transição juvenil/adulta e adulta), incluindo mudanças no hábito de crescimento, taxa de crescimento, anatomia do caule, filotaxia, estrutura foliar, enraizamento, capacidade de floração e conteúdo hormonal (HACKETT, 1987; BAURENS et al., 2004; VALLEDOR et al., 2010).

Segundo Xavier et al. (2013), isso se deve também ao acúmulo de inibidores de enraizamento e redução dos níveis fenólicos à medida que o tecido se torna mais velho, além da barreira anatômica de tecido lignificado entre o floema e o córtex. A maior lignificação dos tecidos impede a formação de raízes, uma vez que a maturação dos tecidos vegetais constitui uma barreira física à emergência das raízes pela deposição de lignina nas paredes celulares, além de reduzir a habilidade fisiológica em formar primórdios radiculares (HARTMANN et al., 2011; XAVIER et al., 2013).

Bernades (2016) estudando o enraizamento de estacas herbáceas e semilenhosas oriundas dos genótipos adultos de *Lecythis pisonis*, observou ao final de 120 dias, 100% de mortalidade das estacas de todos os genótipos. Betanin e Nienow

(2010), verificaram que estacas caulinares herbáceas de *Erythrina falcata* sem folhas, com dois anos de idade, apresentaram elevada mortalidade e ausência de enraizamento na estaquia.

Uma das expressões mais consistentes de maturação em plantas lenhosas é a redução do potencial de regeneração, incluindo o declínio na capacidade de enraizamento e vigor de estacas (WENDLING et al., 2014). A perda de enraizamento relacionada à maturação é um fator limitante importante na propagação de espécies lenhosas (TRUEMAN, 2006; TRUEMAN et al., 2007; PIJUT et al., 2011; HUSEN, 2012) e, conseqüentemente, no estabelecimento de plantações que dependem de seleção de árvores maduras.

6. CONCLUSÕES

O minijardim clonal apresenta potencial quanto à multiplicação vegetativa das minicepas, permitindo coletas sucessivas de brotações juvenis;

A utilização de AIB em miniestacas de *D. nigra* não é um condicionante para o enraizamento, embora a adição de 6.000 mg Kg⁻¹ AIB promoveram efeito significativo para as variáveis analisadas em miniestacas apicais, proporcionando maior CR, NR, VIG e MSR;

A adição de 6.000 mg Kg⁻¹ AIB em miniestacas intermediárias antecipou o TMER e proporcionou maior número de raízes adventícias, entretanto, as concentrações de AIB reduziram linearmente a emissão de BR, MSPA e MST;

O teor nutricional da planta matriz influenciou no enraizamento de miniestacas, sendo a procedência de linhares mais responsiva a adição de FLC;

As procedências geográficas apresentaram um conjunto de respostas e comportamento diferencial no enraizamento;

As estacas de material adulto apresentaram elevada mortalidade e ausência de enraizamento;

A miniestaquia, utilizando material juvenil, mostrou-se tecnicamente viável como forma de propagação de *Dalbergia nigra*, sendo possível usar esta metodologia para produção de mudas em larga escala.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças de eucalipto**. 2 ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 500 p.

ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwood with emphasis on Eucalyptus. In: WALTER, C.; CARSON, M. Plantation Forest biotechnology for the 21th century. New Delhi, India, Research Sign Post, 2004, p. 303-333.

AZAD, M. S.; ALAM, M. J.; MOLLICK, A. S.; KHAN, M. N. I. Rooting of cuttings of the wild Indian almond tree (*Sterculia foetida*) enhanced by the application of indole-3-butyric acid (IBA) under leafy and non-leafy conditions. **Rhizosphere**, v. 5, p. 8-15, 2018.

BAURENS, F. C.; NICOLLEAU, J.; LEGAVRE, T.; VERDEIL, J. L.; MONTEUUIS, O. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated in vitro with reference to leaf morphology as a phase change marker. **Tree Physiology**, v. 24, n. 4, p. 401-407, 2004.

BATISTA, A. F.; DOS SANTOS, G. A.; SILVA, L. D.; QUEVEDO, F. F.; DE ASSIS, T. F. Influência do sistema de corte basal de miniestacas na propagação clonal de híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* subsp. *maidenii*. **Revista Árvore**, v. 38, n. 6, p. 1115-1122, 2014.

BERNARDES, V. P. **Resgate e propagação vegetativa de *Lecythis pisonis* Cambess por estaquia**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.

BETANIN, L.; NIENOW, A. A. Propagação vegetativa da corticeira-daserra (*Erythrina falcata* Benth.) por estaquia caulinar e foliar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 871-880, 2010.

BRASIL. Ministério do meio ambiente. Instrução Normativa n. 43, de 18 de setembro de 2014. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF (2014 set. 18).

BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; MELO, L. A.; ROSADO, A. M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p.425-434, 2011.

CALDEIRA, M. V. W.; RONDON NETO, R. M.; SCHUMACHER, M. V. Avaliação da eficiência nutricional de três procedências australianas de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, v. 26, n. 5, p. 615-620, 2002.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa, 2003, 1039 p.

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N.; BARROS, N. F.; LEITE, H. G.; LEITE, F. P. Relação do estado nutricional de minicepas com o número de miniestacas de eucalipto. **Scientia Florestais**, v. 36, n. 79, p. 203-213, 2008.

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N.; BARROS, N. F.; LEITE, H. G.; LEITE, F. P. Influência do estado nutricional de minicepas com enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 33, n. 4, p. 607-615, 2009.

DIAS, P. C.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S. D.; PAIVA, H. N. D.; CORREIA, A. C. G. Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 36, n. 3, p. 389-399, 2012.

DIAS, P. C.; XAVIER, A.; DE OLIVEIRA, L. S.; CORREIA, A. C. G.; BARBOSA, G. A. Tipo de miniestaca e de substrato na propagação vegetativa de Angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan). **Ciência Florestal**, v. 25, n. 4, p. 909-919, 2015.

FERREIRA, M.; ARAUJO, A. J. **Procedimentos e recomendações para testes de procedências**. Curitiba: EMBRAPA/URPFCS, 1981. Documentos, 6.

HACKETT, W. P. Donor plant maturation and adventitious root formation. **Advances in plant sciences series**, 1988.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th. ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011. 900 p.

HOLT, J.S. Plant response to light: a potential tool for weed management. **Weed Science**, v. 43, p. 474-482, 1995.

HUSEN, A.; GONDAR, E. Changes of Soluble Sugars and Enzymatic Activities During Adventitious Rooting in Cuttings of *Grewia optiva* as Affected by Age. **American Journal of Plant Physiology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2012.

KAGEYAMA, P. Y. **Variação genética entre procedências de Pinus oocarpa Schiede na região de Agudos-SP**. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de plantas). Piracicaba: ESALQ, 1977. 83p.

KALIL FILHO, A. N.; HOFFMANN, H. A.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de liquidambar por enxertia**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 7 p. (Circular técnica, 137).

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da OEA, 1983. 174p.

LIMA, C. C.; OHASHI, S. T.; SILVEIRA, A. S. Efeito de diferentes concentrações de AIB e procedências geográficas no enraizamento de estacas de paricá. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 3, p. 1282-1292, 2018.

LIMA, H. C. de 2015. *Dalbergia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22915>>. Acesso em: 10 de out de 2018.

MANKESSI, F.; SAYA, A.; BAPTISTE, C.; NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. In vitro rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. **Trees**, v. 23, n. 5, p. 931-940, 2009.

MELO, L. A.; XAVIER, A.; DE PAIVA, H. N.; BORGES, S. R. Otimização do tempo necessário para o enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 35, n. 4, p. 759-767, 2011.

MORAIS, E. D.; BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F.; BRANDI, R. M. Biomassa e eficiência nutricional de espécies de eucalipto em duas regiões bioclimáticas de Minas gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, n. 3, p. 353-362, 1990.

NAVROSKI, M. C.; BIALI, L. J.; BIANCHIN, J. E.; CAMARGO, L.; SCHUMACHER, M. V. Quantificação de biomassa e comprimento de raízes finas em povoamento de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 4, 2010.

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, 2010.

OLIVEIRA, T. P. D. F.; BARROSO, D. G.; LAMÔNICA, K. R.; ARAÚJO CARNEIRO, J. G.; OLIVEIRA, M. A. Productivity of polyclonal minigarden and rooting of *Handroanthus heptaphyllus* Mattos minicuttings. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, p. 2423-2432, 2015.

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

PEÑA PEÑA, M. L.; ZANETTE, F.; BIASI, L. A. Época de coleta e ácido indolbutírico no enraizamento de miniestacas de pitangueira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 5, p. 3055-3068, 2015.

PIJUT, P. M.; WOESTE, K. E.; MICHLER, C. H. Promotion of Adventitious Root Formation of Difficult-to-Root Hardwood Tree Species. **Horticultural reviews**, v. 38, p. 213, 2011.

PIRES, P.; WENDLING, I.; AUER, C.; BRONDANI, G. Sazonalidade e soluções nutritivas na miniestaquia de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 39, n. 2, p. 283-293, 2015.

R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

SAMPAIO, P. T. B.; SIQUEIRA, J. A. S.; COSTA, S.; BRUNO, F. M. S. Propagação vegetativa por miniestacas de preciosa (*Aniba canellila* (H. B.K) MEZ). **Acta Amazônica**, v. 40, n. 4, p. 687-692, 2010.

SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 9, p. 2565-2577, 2013.

SCHLICHTING, C. D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, n. 1, p. 667-693, 1986.

TRUEMAN, S. J. Clonal propagation and storage of subtropical pines in Queensland, Australia. **Southern African Forestry Journal**, v. 208, n. 1, p. 49-52, 2006.

TRUEMAN, S. J.; PEGG, G. S.; KING, J. Domestication for conservation of an endangered species: the case of the Wollemi pine. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v. 1, p. 1-10, 2007.

VALLEDOR, L.; MEIJÓN, M.; HASBÚN, R.; CAÑAL, M. J.; RODRÍGUEZ, R. Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of in vitro organogenic capability. **Journal of plant physiology**, v. 167, n. 5, p. 351-357, 2010.

VIA, S. The evolution of phenotypic plasticity: What do we really know? In: Real LA, ed. **Ecological genetics**, p.35-57, 1994.

WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: CONGRESSO SUL – AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003. Chapecó. Anais....Chapecó: Epagri, 2003. 1CD-ROM.

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**, v. 45, n. 4, p. 449-471, 2014.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 249-278, 1989.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa, MG: SIF, 1998. 10 p.

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

CAPÍTULO III – DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Dalbergia nigra* EM MINIJARDIM CLONAL

RESUMO

SANTOS, Aline Ramalho dos. **Diversidade genética de *Dalbergia nigra* em minijardim clonal**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Coorientador: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda.

Dalbergia nigra é uma espécie endêmica do Brasil, que possui uma das mais valiosas madeiras brasileiras. Submetida a um intenso processo de exploração, encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção. A necessidade de preservação, bem como de plantios de reflorestamento com maior variabilidade genética são condições que justificam o estudo e subsidiam estratégias de conservação genética. Neste contexto, objetivou-se com este estudo, caracterizar a diversidade genética em minijardim clonal de *D. nigra*. Amostras de DNA de 90 indivíduos obtidos a partir de duas procedências, a saber Viçosa, Minas Gerais e Linhares, Espírito Santo, foram analisadas por meio de marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* – ISSR. Foram avaliados o número total de bandas, número de bandas polimórficas, conteúdo de informação polimórfica, número ótimo de marcadores, complemento do coeficiente de Jaccard para a dissimilaridade genética e o método UPGMA para agrupamento dos genótipos, índice de diversidade de Nei e índice de Shannon, fluxo gênico, análise de variância molecular e abordagem bayesiana. Foram selecionados 11 *primers*, os quais geraram 180 fragmentos (70,76% de polimorfismo). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada marcador atingiu o valor médio de 0,38, já o número ótimo de locos ISSR para obter precisão desejada nas análises de diversidade genética foi a partir de 122 fragmentos polimórficos. Alta diversidade genética foi encontrada com os parâmetros, diversidade genética do índice de Shannon ($I = 0,5538$) e Nei ($H = 0,3742$) para a amostragem da espécie. Para as minicepas de Viçosa os valores correspondem a 0,4963 e 0,3334 e 0,5328, 0,3563 nas minicepas de Linhares. Na representação gráfica das distâncias genéticas formaram-se 10 grupos, sendo três deles com apenas um genótipo em cada grupo. Entre os indivíduos da procedência de Viçosa, revelou-se a presença de cinco grupos, sendo um deles isolado. Para as comparações entre os indivíduos da procedência de Linhares, o agrupamento pelo método UPGMA revelou sete grupos,

dois deles com apenas um indivíduo em cada grupo. A análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de *D. nigra* indicam moderada diferenciação genética ($\Phi_{ST} = 0,118$). Outro fator que corrobora na análise da estruturação é a estatística ΔK , indicando uma convergência para dois grupos bayesianos ($K=2$). Os marcadores ISSR utilizados para *D. nigra* foram eficientes na detecção de polimorfismo. A população apresentou consistente estruturação e alta diversidade genética. A maior riqueza é encontrada nas minicepas do Linhares. As populações de *D. nigra* apresentam moderada diferenciação genética, sendo verificada que a maior proporção da diversidade genética está dentro das populações. As minicepas apresentam elevada diversidade e, portanto, revela potencial para serem utilizados como matrizes para coleta de propágulos na produção de mudas para fins conservacionistas.

Palavras-chave: extinção, conservação genética, minicepas, propagação, ISSR, marcadores moleculares.

ABSTRACT

SANTOS, Aline Ramalho dos. **Genetic diversity of *Dalbergia nigra* in miniclonal garden**. 2019. Dissertation (Master of Forest Science) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Prof^a. Dr^a. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Co-adviser: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda.

Dalbergia nigra is an endemic species from Brazil, which has one of the most valuable Brazilian woods. Undergoing an intense process of exploitation, it is on the list of species threatened with extinction. The need for preservation, as well as reforestation plantations with greater genetic variability, are conditions that justify the study and subsidize genetic conservation strategies. In this context, the aim of this study was to characterize the genetic diversity in the miniclonal garden of *D. nigra*. DNA samples from 90 individuals obtained from two sources, namely Viçosa, Minas Gerais and Linhares, Espírito Santo, were analyzed by means of Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. The total number of bands, number of polymorphic bands, polymorphic information content, optimal number of markers, complement of the Jaccard coefficient for genetic dissimilarity and the UPGMA method for genotype clustering, Nei diversity index and Shannon index, gene flow, molecular variance analysis, and Bayesian approach. Eleven primers were selected, which generated 180 fragments (70.76% polymorphism). The polymorphic information content (PIC) for each marker reached the mean value of 0.38, since the optimal number of ISSR loci to obtain desired accuracy in the analyzes of genetic diversity was from 122 polymorphic fragments. High genetic diversity was found with the parameters, genetic diversity of the Shannon index ($I = 0.5538$) and Nei ($H = 0.3742$) for the species sampling. For the ministumps of Viçosa the values correspond to 0.4963 and 0.3333 and 0.5328, 0.3563 in the ministumps of the Linhares. In the graphical representation of the genetic distances ten groups were formed, three of them with only one genotype in each group. Among the individuals from Viçosa, the presence of five groups was shown, one of them being isolated. For the comparisons between the individuals from the Linhares origin, the UPGMA grouping revealed seven groups, two of them with only one individual in each group. The analysis of molecular variance (AMOVA) for populations of *D. nigra* indicates moderate genetic

differentiation ($\Phi_{ST} = 0.118$). Another factor that corroborates in the structure analysis is the statistic ΔK , indicating a convergence for two Bayesian groups ($K = 2$). The ISSR markers used for *D. nigra* were efficient in detecting polymorphism. The population showed consistent structure and high genetic diversity. The greatest wealth is found in the ministumps of the Linhares. The populations of *D. nigra* present moderate genetic differentiation, being verified that the greater proportion of the genetic diversity is within the populations. The ministumps present high diversity and, therefore, it reveals the potential to be used as matrices for the collection of propagules in the production of seedlings for conservation purposes.

Keywords: extinction, genetic conservation, ministumps, propagation, ISSR, molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

Dalbergia nigra (Vell.) Fr. All. ex Benth, popularmente conhecida como jacarandá-da-Bahia, é uma espécie arbórea endêmica da Floresta Atlântica Brasileira, com distribuição natural nos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (CARVALHO, 2003; LIMA, 2015).

Devido ao elevado valor econômico de sua madeira, foi alvo de intensa exploração extrativista, que somado ao desmatamento do seu ambiente natural, resultou sua inclusão na lista de espécies florestais ameaçadas de extinção (RESENDE et al., 2011). Além disso, estudos conduzidos mostram que a fragmentação das subpopulações e do hábitat está diminuindo a diversidade genética da espécie (CENTRO NACIONAL DE CONSERVACAO DA FLORA – CNCFLORA, 2012). Populações pequenas e isoladas sofrem endogamia, acelera a perda da diversidade genética, o que leva a depressão endogâmica e menor habilidade de evoluírem em resposta as mudanças ambientais (FRANKHAM et al., 2008).

Considerando o panorama descrito, a obtenção de informações que revelem os níveis de diversidade genética, bem como os processos que a mantém, tornam-se necessários quando se deseja praticar medidas conservacionistas (MELO et al., 2015), e justificam estudos que elucidem melhor os aspectos relacionados à produção de mudas visando aos plantios para fins comerciais ou ambientais (GONÇALVES et al., 2014a).

A propagação da espécie é realizada principalmente por meio de sementes, devido ao maior domínio da técnica, porém, a dificuldade em se obter sementes viáveis, associado a floração e frutificação supra-anual, com quantidade de sementes variável de ano a ano, são fatores que limitam a produção de mudas. Dessa forma, a propagação vegetativa ou assexuada de *D. nigra* vêm ao encontro da superação das dificuldades da propagação seminífera possibilitando assim auxiliar no resgate e conservação de recursos genéticos florestais (DIAS et al., 2012), bem como base para silvicultura clonal.

O conhecimento sobre a organização da variabilidade genética de populações é um passo fundamental para a determinação de estratégias mais adequadas de conservação da biodiversidade (AVISE, 2010), como por exemplo, na formação de

minijardim clonal, os quais constituem meio de conservação da variabilidade genética de determinada espécie fora de sua comunidade natural (*ex situ*) (CARVALHO et al., 2009).

A caracterização genética é essencial para revelar se os genótipos são promissores e se as fontes de germoplasma são geneticamente diversas, visto que, o plantio de mudas oriundas de matrizes aparentadas pode levar ao estreitamento da base genética, encadeando em futuras populações com base genética estreita que por consequência, serão mais vulneráveis a doenças, condições climáticas adversas e procriação consangüínea, ameaçando a persistência a longo prazo das espécies (HOFFMANN; SGRO, 2011). Assim, a propagação de plantas geneticamente distintas é uma importante prática de conservação para espécies em vias de extinção.

Neste sentido, vários estudos que têm como objetivo analisar a variabilidade genética em populações naturais vem utilizando os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), pois são eficazes na detecção de polimorfismo, têm baixo custo, são abundantes no genoma e reprodutíveis entre laboratórios (ZIETKIEWICZ et al., 1994; SANTANA et al., 2011; MORAES FILHO et al., 2015; GIUSTINA et al., 2014; SOUZA et al., 2017; PASCHOA et al., 2018; TIAGO et al., 2018). Esse tipo de marcador permite a identificação de diversidade genética neutra intra e interpopulacional e, com isso, fundamentam-se como uma ferramenta bastante útil em programas de melhoramento e estudos para conservação de recursos genéticos (LORENZONI et al., 2014).

A hipótese a ser testada, neste trabalho, está embasada nas seguintes perguntas: Como a diversidade genética esta particionada entre e dentro das procedências de *D. nigra*? Qual a magnitude da variabilidade genética entre as mudas de *D. nigra* cultivadas no minijardim clonal? É possível desenvolver a produção massal de mudas de *D. nigra* com maior variabilidade genética?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade genética em minijardim clonal de *D. nigra*

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência de amplificação, com amostras de DNA de *D. nigra* para 24 marcadores moleculares ISSR;
- Estimar a magnitude e a distribuição da variabilidade genética em minijardim clonal de *D. nigra*, utilizando marcadores moleculares ISSR pré-selecionados;
- Analisar como a diversidade genética está particionada entre e dentro das procedências de *D. nigra*;

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção e seleção do material para caracterização genética

As matrizes de *D. nigra* amostradas neste estudo encontram-se alocadas em minijardim clonal, 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), localizado no município de Jerônimo Monteiro – ES, apresentando latitude de 20° 47'S e longitude de 41° 24'W e altitude de 120 m.

Figura 4.1 - Minijardim clonal de *D. nigra* conduzido em vasos. Jerônimo Monteiro, Brasil, 2019.



Fonte: a autora

As plantas matrizes que compõem o jardim miniclinal foram obtidas de acordo com as recomendações de Xavier e Wendling (1998), formado a partir de minicepas obtidas por propagação sexuada (semente), originadas de duas procedências de sementes de *D. nigra*, sendo uma coletada no município de Viçosa, Minas Gerais e a outra no município de Linhares, Espírito Santo, adquiridas via comercialização realizada por empresa registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - 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 (°C)	Altitude média (m)	Umidade relativa (%)	Horas 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).

A seleção dos indivíduos para a extração do DNA foi realizada aleatoriamente em cada procedência de *D. nigra*, levando-se em consideração a quantidade total de indivíduos e a disponibilidade de folhas jovens e em bom aspecto fitossanitário.

Amostraram-se 90 indivíduos, sendo que 38 representaram a procedência Viçosa e 52 de Linhares. O número de indivíduos amostrados em cada subunidade foi variável, contudo foi representativo da quantidade total de indivíduos (600 minicepas).

3.2 Extração de DNA

O protocolo para a extração de DNA genômico foi baseado no método descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações propostas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), adequado para espécies vegetais com altas concentrações de polissacarídeos.

As amostras foliares dos indivíduos de cada unidade amostral foram coletas e acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados, contendo sílica gel para minimizar o processo de oxidação e encaminhados ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (BqMol) do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES).

No laboratório, as amostras foram transferidas para sacos de alumínio e armazenadas em *freezer* -30 °C por no mínimo 24 horas para prepará-las para a liofilização (Liofilizador L108 da Liobras). Após liofilizadas, as amostras foram novamente ensacadas com sílica e armazenadas em caixas vedadas.

Cerca de 300 mg de tecido foliar liofilizado, foi triturado individualmente em almofariz com pistilo de porcelana, transferidos para microtubos de 2 mL e adicionado 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), agitado no vortex, incubado a 65 °C por 30 minutos e homogeneizado manualmente com inversões suaves a cada 10 minutos.

Em seguida ao banho-maria adicionou-se 650 μ L de Clorofórmio-Álcool Isoamílico (CIA) e homogeneizou-se manualmente por 10 minutos até formação de uma emulsão, em seguida, centrifugou-se a 12000 rpm (centrífuga Pico 21 da Thermo Scientific, raio de 7,5 cm) por 10 minutos.

A fase aquosa formada na centrifugação foi transferida para um novo microtubo de 2 mL, adicionou-se 200 μ L de tampão de extração juntamente com 650 μ L de CIA, foram homogeneizadas e logo em seguida centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi mais uma vez transferida, no entanto, para um microtubo de 1,5 mL, no qual foi adicionado 650 μ L de CIA e centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos.

Ao final dessa etapa, a fase aquosa foi transferida para outro microtubo de 1,5 mL, adicionou-se 1 volume de isopropanol gelado, 230 μ L de acetato de amônio e centrifugou-se a 12000 rpm por mais 10 minutos para precipitar o DNA. O precipitado gerado foi lavado 3 vezes com 250 μ L de etanol 70% e posto para secar. Seguidamente, o DNA foi ressuspense em 50 μ L de TE + RNAse e colocado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Ao concluir as extrações, a quantificação do DNA obtido foi efetuada com uso do espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Scientific* 2000C), a fim de determinar a pureza e as concentrações das amostras.

Os microtubos contendo o DNA estoque concentrado foram armazenados em *freezer* -30 °C, salvo a retirada de alíquotas na concentração de 10 ng $\cdot\mu$ L⁻¹ para manipulação habitual, estocadas em *freezer* -20 °C para serem utilizadas em análises moleculares.

3.3 Amplificações com marcadores *Inter-Simple Sequence Repeat* – ISSR

Para a realização dos testes de amplificação foram utilizadas inicialmente 24 *primers* ISSR (Tabela 3.2), a fim de que fossem selecionados os iniciadores mais polimórficos, com melhor perfil de amplificação, bandas nítidas e distintas, sendo os testes iniciais realizados em amostras de DNA de quatro indivíduos.

Tabela 3.2 - *Primers* ISSR desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC) e suas respectivas sequências (5'-3') testados em amostras de DNA de quatro indivíduos da espécie *D. nigra*.

Primers	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).

As Reações de Polimerase em Cadeia (PCR) foram realizadas em um volume final de 20 µL por amostra, sendo o mix constituído por: tampão 1X (10 mM de Tris-HCl

pH 8,5 e 50 mM de KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,2 µM de *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas com auxílio de um termociclador Veriti[®], com etapa inicial de desnaturação a 94 °C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C, por 45 segundos, anelamento de 52 °C, por 45 segundos, e 72 °C, por 90 segundos, com extensão final de 72 °C, por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% com tampão TBE 1X (10,8 g/L Tris-base; 5,5 g/L Ácido Bórico; 0,83 g/L EDTA e água destilada), a uma voltagem de 100 Volts, com duração de aproximadamente 5 horas. Em seguida, os géis foram cuidadosamente retirados e submergidos em solução de brometo de etídio (0,50 µg/mL) durante 40 minutos.

Posteriormente, os géis foram lavados em água corrente para a remoção do excesso de brometo e 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.

Os *primers* que geram os melhores perfis de amplificação foram então selecionados e utilizados para genotipar todos os 90 indivíduos amostrados do minijardim clonal. As condições de PCR e eletroforese foram as mesmas anteriormente descritas na etapa de seleção dos *primers* ISSR.

3.4 Análise dos dados moleculares

A partir dos géis fotodocumentados foi efetuada uma análise visual cuidadosa, que permitiu observar os padrões de bandas gerados em cada *primer*. Bandas ISSR que ocupavam a mesma posição para os 90 indivíduos indicavam amplificação do mesmo fragmento de DNA, ou seja, uma banda monomórfica para aquele loco, por outro lado, as bandas que ocupavam posições distintas eram de locos diferentes e, portanto polimórficas.

A partir dessa análise foi gerada uma matriz binária, onde foi atribuído valor igual a 1 para a presença de banda e 0 para ausência, sendo consideradas apenas bandas evidentes. Para dados perdidos foi atribuído diferentes valores e símbolos

necessários para cada programa estatístico. Foram realizadas análises descritivas dos dados, incluindo 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).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada loco de ISSR foi calculado para discriminar o poder do marcador molecular em detectar polimorfismos entre os indivíduos, conforme proposto por Roldàn-Ruiz et al. (2000), tendo como indicadores a ausência e a presença de bandas:

$$PIC_i = 2f_i (1 - f_i)$$

Em que:

PIC_i = O conteúdo de informação polimórfica do marcador i ;

f_i = A frequência dos fragmentos presentes na amostra;

$1 - f_i$ = A frequência dos fragmentos ausentes.

A matriz binária foi submetida a análises estatísticas, com aplicações a nível intrapopulacional e interpopulacional (unidades amostrais). Para determinar o número ótimo de locos polimórficos necessários para a caracterização da diversidade genética de *D. nigra*, foi realizada a análise de *bootstrap* com o auxílio o software GENES (CRUZ, 2013).

Para cada par de indivíduos foram realizadas simulações 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, sendo o número de fragmentos considerado ideal quando o valor for inferior a 0,05 e a correlação mais próxima de 1 (KRUSKAL, 1964).

3.5.1 Análises intrapopulacionais

A distância genética entre as minicepas de *D. nigra* foi realizada por meio da dissimilaridade entre indivíduos comparados par a par. Foram estimados inicialmente os coeficientes de similaridade (S) entre os pares de indivíduos com base no coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1901), representado pela razão entre o número de

coincidências e o número total de bandas, excluindo a coincidência negativa (d) (MEYER et al., 2004), sendo:

$$S_j = \frac{a}{a+b+c}$$

Onde:

a = Número de coincidências do tipo 1 – 1 para cada par de indivíduos;

b = Número de discordâncias do tipo 1 – 0 para cada par de indivíduos;

c = Número de discordâncias do tipo 0 – 1 para cada par de indivíduos;

d = Número de coincidências do tipo 0 – 0 para cada par de indivíduos.

A dissimilaridade entre os indivíduos par a par por sua vez, foi gerada a partir da similaridade, pela expressão:

$$D = 1 - S$$

Onde:

D= Dissimilaridade

S= Similaridade

Com base na matriz de dissimilaridade, foi realizada a análise de agrupamento utilizando o método da ligação média não ponderada entre grupos (UPGMA). O cálculo do ponto de corte (PC) para determinar o número ideal de grupos foi estimado como proposto por Mojema (1997), pela equação:

$$P_c = m + k \cdot dp$$

Onde:

m = a média dos valores de distância dos níveis de fusão correspondentes aos estádios;

k = 1,25 (MILLIGAN; COOPER, 1985);

dp = desvio padrão.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi utilizado para avaliar a consistência entre agrupamentos hierárquicos e os dados originais (matriz de semelhança). Todas as análises descritas acima foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2013).

Os parâmetros de diversidade genética, tais como número de alelos observados (N_a), número de alelos efetivos (N_e), índice de diversidade genética de Nei (H') (NEI, 1978) e índice de Shannon (I) (SHANNON; WIEVER, 1949), foram calculados utilizando o programa POPGENE 1.32 (YEH et al., 1997), para cada uma das unidades amostrais e no contexto da espécie considerando todos os indivíduos amostrados.

3.5.2 Análises interpopulacional

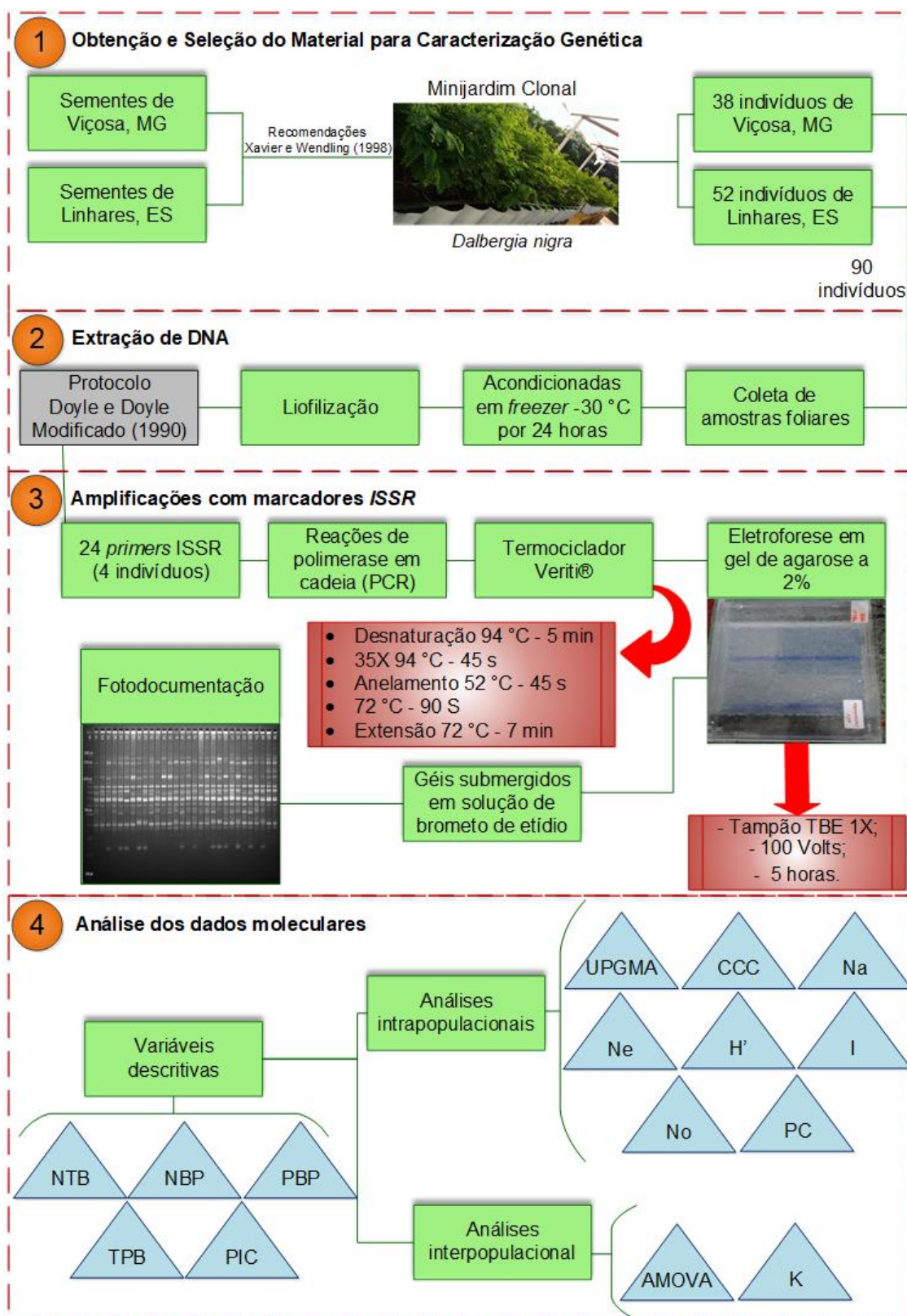
Calculou-se a análise de variância molecular (AMOVA) de acordo com Excoffier, Smouse e Quattro (1992), para revelar a diversidade genética dentro e diferenciação entre as unidades amostrais, com o auxílio do programa Arlequin, versão 3.11.

O fluxo gênico histórico entre as localidades amostrais foi estimado indiretamente a partir da diferenciação genética entre grupos (ϕ_{ST}), em função de Nm , pela fórmula $Nm = 0.5 (1 - \phi_{ST}) / \phi_{ST}$ (McDERMOTT; McDONALD, 1993), com base no estimador de fluxo gênico histórico da AMOVA.

Para inferir o número de grupos genéticos (K) nos quais os genótipos encontram-se estruturados, os dados moleculares foram submetidos a uma 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 $K = 5$, com 7.500 interações de Monte Carlo, via Cadeias de Markov (MCMC) com um descarte inicial (burn-in) de 2.500 interações. O número de grupos genéticos foi estimado pelo método ad hoc ΔK proposto por Evanno; Regnaut e Goudet (2005) usando o software STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012).

O fluxograma metodológico dos passos necessários para o estudo da diversidade genética de *D. nigra* é apresentada na Figura 4.2.

Figura 4.2 - Etapas metodológicas necessárias para a caracterização da diversidade genética em minijardim clonal de *Dalbergia nigra*.



4. RESULTADOS

4.1 Seleção dos *primers* ISSR

Entre os 24 *primers* ISSR testados (Tabela 3.2), 11 apresentaram bom padrão de amplificação, bandas nítidas e bem definidas, os quais possibilitaram a obtenção de 128 fragmentos (Tabela 3.3 e Figura 4.3).

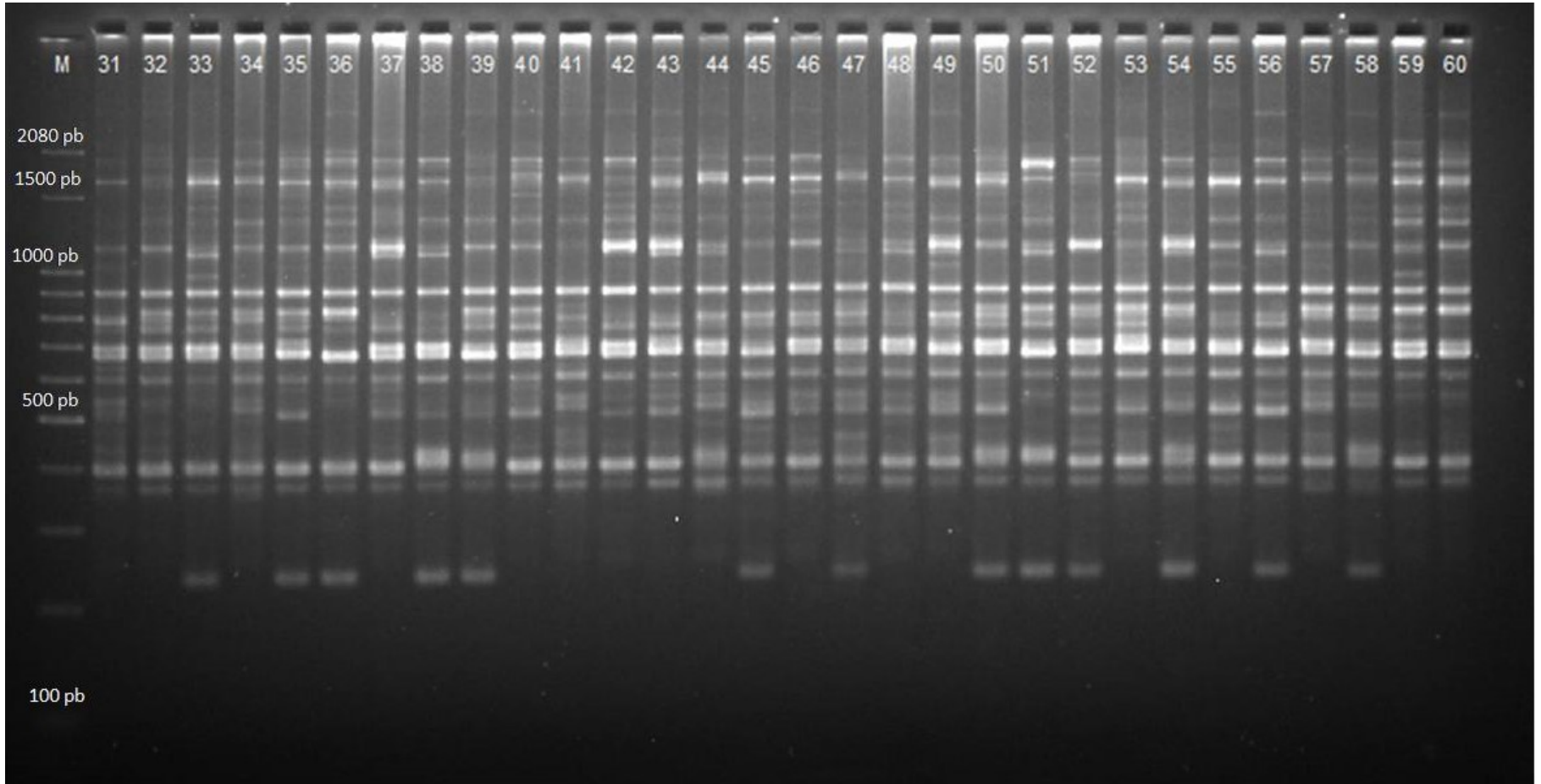
Tabela 3.3 - *Primers* ISSR selecionados para *D. nigra*, incluindo a faixa de variação de tamanho dos locos em pares de bases (TPB), número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer* e conteúdo da informação de polimorfismo (PIC).

Primer	Variação	NTB	NBP	PBP	PIC
UBC 807	300 – 2000	20	14	70,00%	0,37
UBC 809	500 – 1800	20	17	85,00%	0,42
UBC 810	300 – 2080	22	19	86,36%	0,40
UBC 811	450 – 2080	17	11	64,70%	0,31
UBC 812	400 – 2080	19	11	57,89%	0,34
UBC 813	500 – 1500	12	9	75,00%	0,42
UBC 814	500 – 1800	12	11	91,66%	0,37
UBC 818	500 – 1550	13	9	69,23%	0,33
UBC 834	400 – 1800	13	8	61,53%	0,39
UBC 840	230 – 2000	19	12	63,15%	0,37
UBC 868	600 – 2000	13	7	53,84%	0,40
Total	-	180	128	70,76%	0,38

O número de fragmentos polimórficos por iniciador variou de 7 (UBC 868) a 19 (UBC 810), com média de 11,63. Dentre o total de 180 bandas obtidas, 128 foram polimórficas, resultando em 70,76% de polimorfismo. O *primer* UBC 810 foi o que resultou maior número de amplificação, com 22 fragmentos, seguido pelos UBC 809 e UBC 807 com 20 fragmentos. Entretanto, o *primer* UBC 814 apresentou o maior percentual de locos polimórficos (91,66%), enquanto a menor porcentagem pode ser observada no UBC 868 com 53,84 % de polimorfismo. O conteúdo de informação

polimórfica (PIC) para cada marcador teve seu valor variando entre 0,31 (UBC 811) a 0,42 (UBC 809 e UBC 813), com média de 0,38.

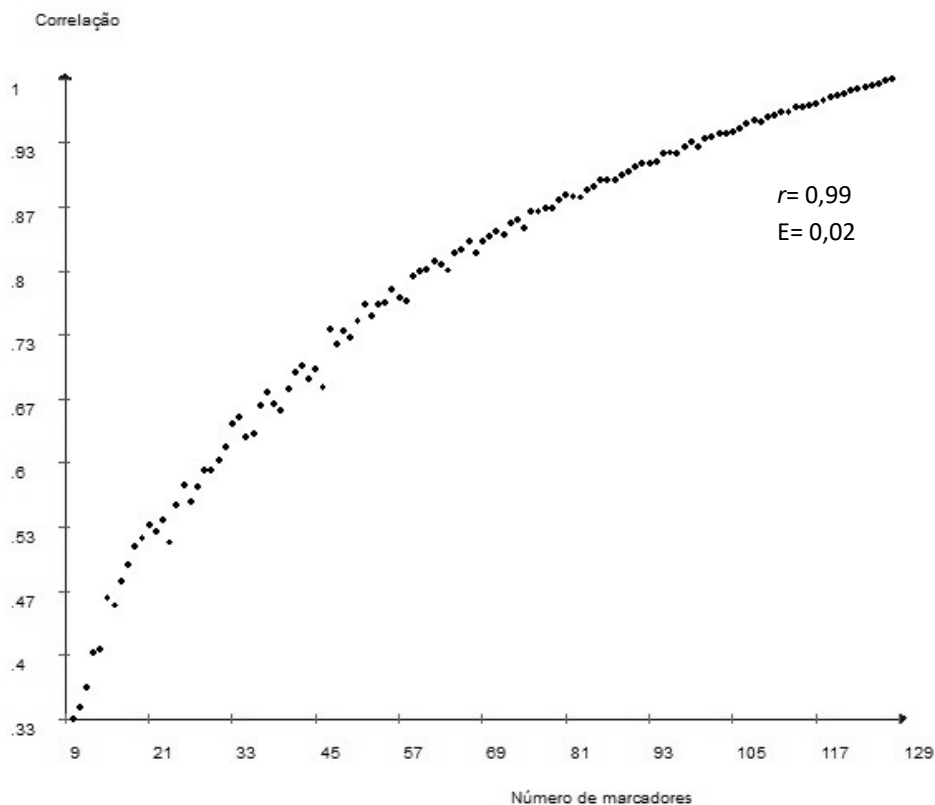
Figura 4.3 - Padrão de bandas demonstrado em gel de agarose 2% produzido pelo *primer* UBC 840 em indivíduos (31 - 60) de *D. nigra*. M – Marcador de peso molecular (*Ladder* 100pb).



Fonte: a autora

O número ótimo de locos ISSR para obter precisão desejada nas análises de diversidade genética foi a partir de 122 fragmentos polimórficos, quando o estresse (E) assumiu valor de 0,02 e a correlação (r) de 0,99 (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Coeficiente de correlação (r) obtido pela análise de *bootstrap* e o número ótimo de fragmentos polimórficos obtidos para a população de *D. nigra*.



4. 2 Análises Intrapopulacionais

A dissimilaridade genética obtida por meio do complemento do coeficiente de Jaccard entre os indivíduos da procedência de Viçosa variaram de 0,23 a 0,66 com média de 0,45. A menor distância genética foi entre os indivíduos 25 e 30 e a maior distância entre as minicepas 2 e 14. A representação gráfica dos agrupamentos revelou a presença de cinco grupos (Figura 4.5), sendo um deles isolado. O ponto de corte estabelecido foi de 47,25%. A consistência do agrupamento verificada pelo coeficiente de correlação cofenética foi de 73,93% (CCC = 0, 7393).

Para as comparações entre os indivíduos da procedência de Linhares, os valores de dissimilaridade variaram de 0,22 a 0,69 com média de 0,45. A menor distância genética foi entre os indivíduos 81 e 82 e a maior distância entre 49 e 81. O agrupamento pelo método UPGMA revelou sete grupos (Figura 4.6), com dois deles com apenas um indivíduo em cada grupo. O ponto de corte estabelecido foi de 49,81% e o coeficiente de correlação cofenética foi de 66,09% (CCC= 0,66).

Na avaliação dos parâmetros genéticos o número médio de alelos observados (N_a) foi igual a 1,99 e o número de alelos efetivos (N_e) 1,64, considerando-se todos os indivíduos amostrados. Para procedência de Viçosa, os valores correspondem a 1,92 e 1,57 e de Linhares, 1,99 e 1,60, respectivamente.

As estimativas da diversidade genética baseadas nos índices de diversidade de Shannon (I) e de Nei (H) foram de 0,4963 e 0,3334 nas minicepas originadas por sementes de Viçosa e 0,5328 e 0,3563 nas minicepas de Linhares. O valor dos índices para toda a amostragem populacional foi de 0,5538 e 0,3742, respectivamente.

Figura 4.5 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 39 indivíduos de *D.nigra* da procedência de Viçosa, Minas Gerais, obtido pelo método UPGMA.

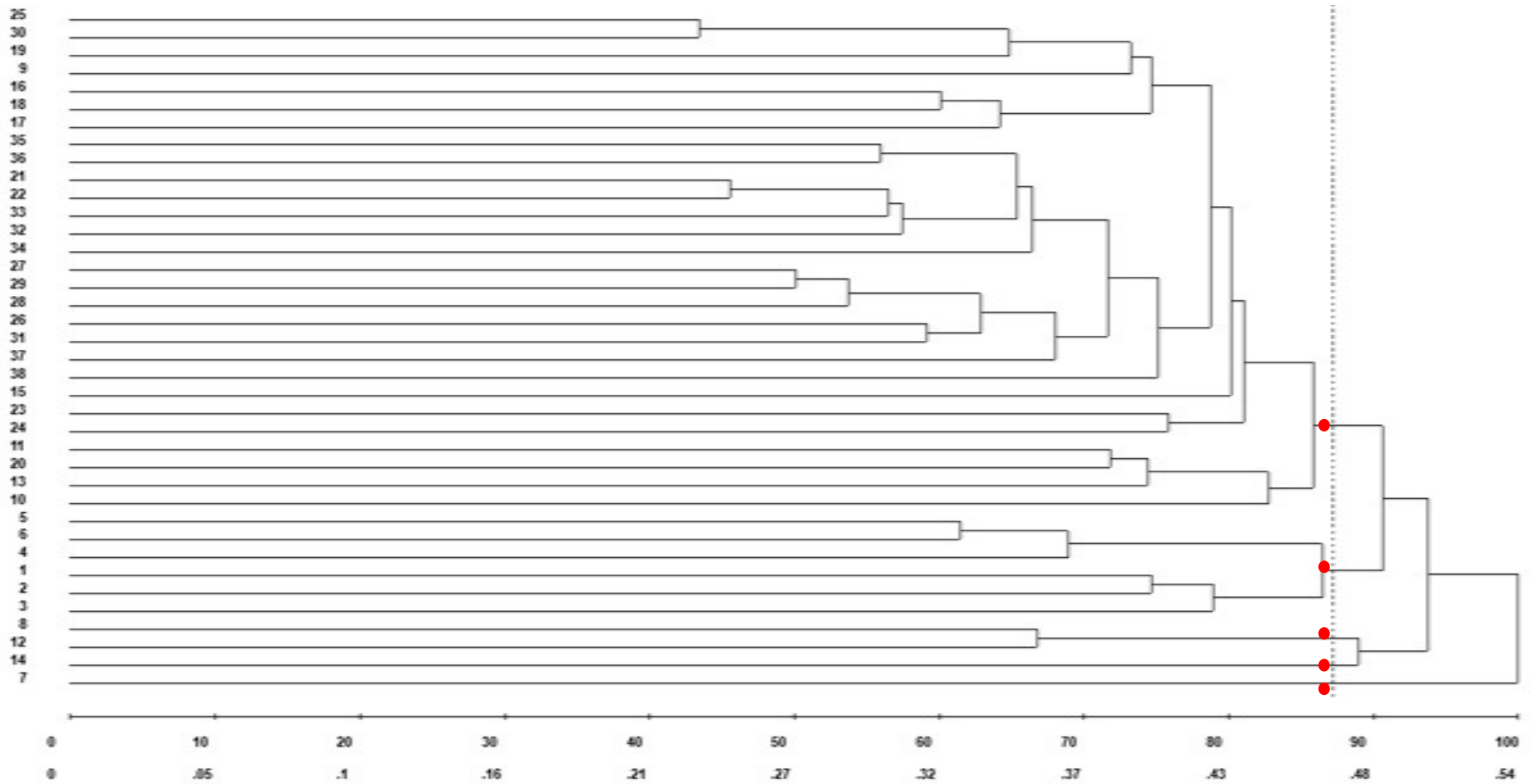
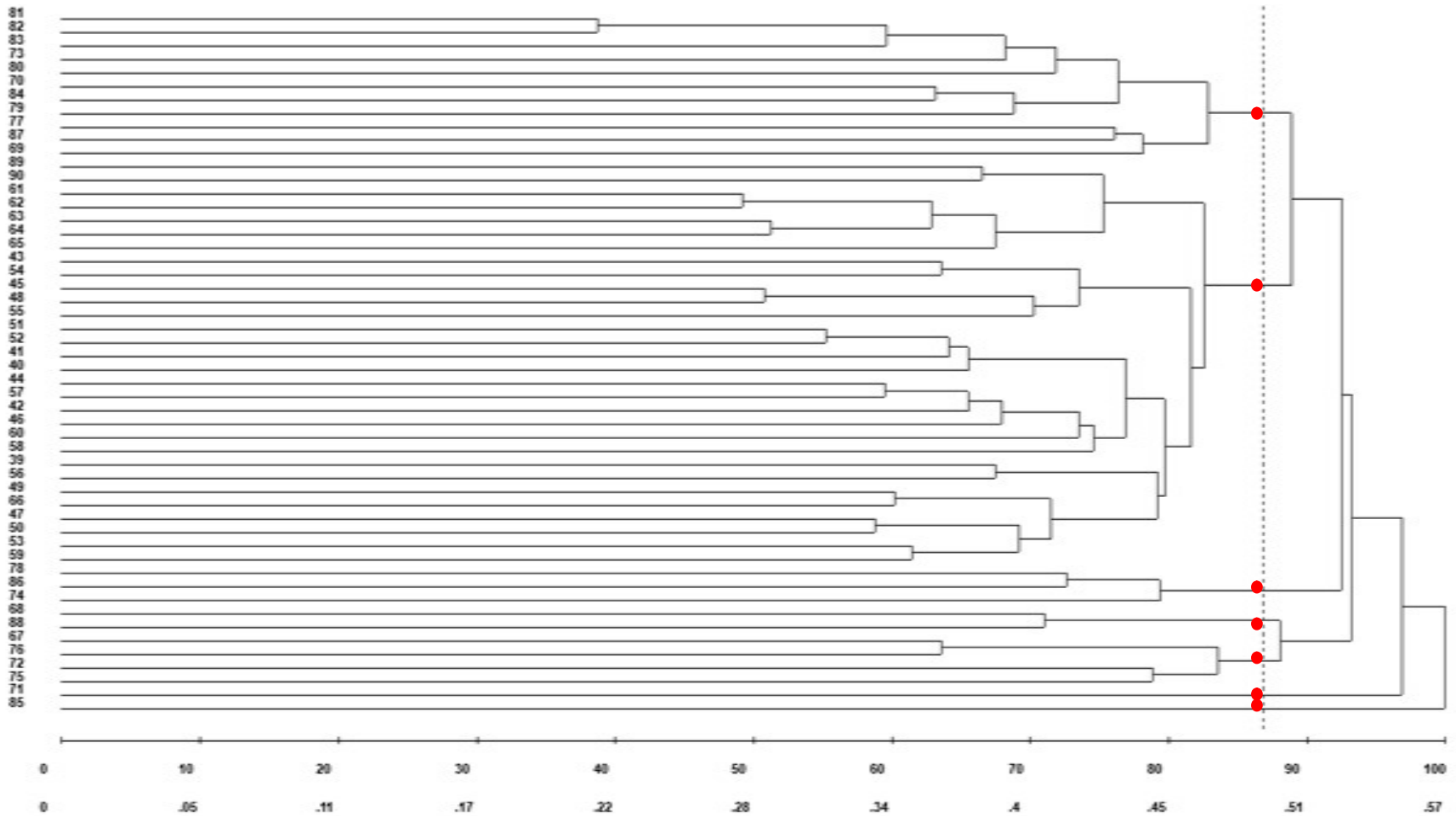


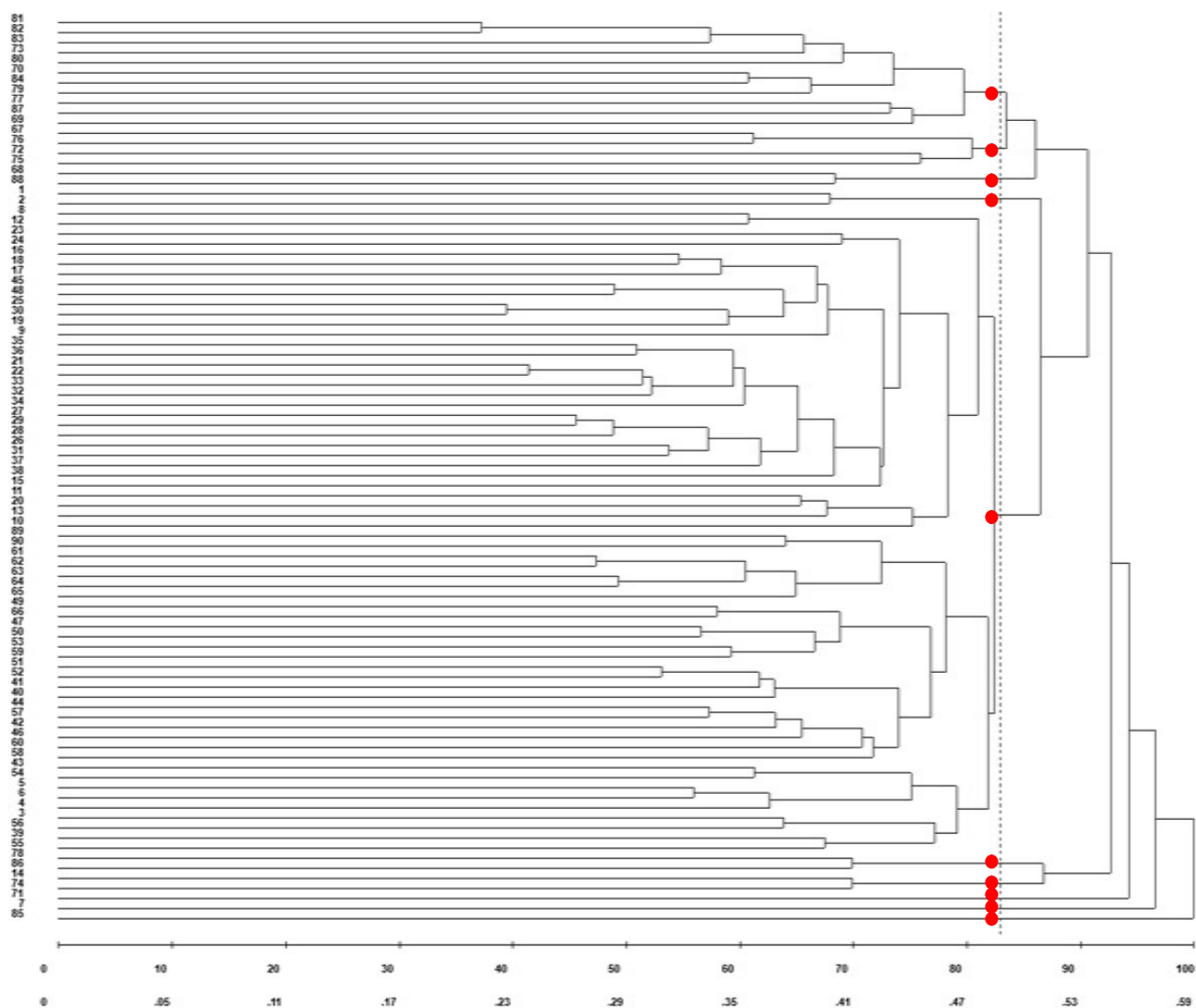
Figura 4.6 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 52 indivíduos de *D.nigra* da procedência de Linhares, Espírito Santo, obtido pelo método UPGMA.



4. 3 Análises interpopulacional

A dissimilaridade genética obtida por meio do complemento do coeficiente de Jaccard entre as procedências de *D. nigra*, variam de 0,22 a 0,72 com média de 0,47, sendo as menores distâncias genéticas evidenciadas entre os genótipos 81 e 82 e a maior dissimilaridade entre os indivíduos 14 e 76. Na representação gráfica das distâncias genéticas formaram-se 10 grupos (Figura 4.5), sendo três deles com apenas um genótipo em cada grupo, o que caracteriza a divergência entre os materiais. O ponto de corte estabelecido foi de 49,72% e coeficiente de correlação cofenética foi de 67,08 % (CCC = 0,6708).

Figura 4.7 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 90 indivíduos de *D. nigra*, obtido pelo método UPGMA.



A análise de variância molecular (AMOVA), indicou uma diferenciação genética global entre as populações (Φ_{ST}) de 0,11847, revelando que 11,85% da variância total foi atribuída à diferenciação genética entre populações e o restante, 88,15% à diversidade genética dentro de populações (Tabela 3.4). Para o fluxo gênico histórico estimado (Nm) o valor corresponde a 3,73.

Tabela 3.4 - Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) de procedências de *D. nigra*.

Fonte de Variação	SQ	Componentes de variação	%de variação
Entre populações	149,45	3,05	11,85
Dentro de populações	1.878,52	22,72	88,15
Total	2.027,97	25,78	

As marcas genéticas encontradas em cada um dos indivíduos definiram o número correto de grupos, baseando na estatística ΔK , indicando uma convergência para dois grupos bayesianos, ou seja, $K=2$ (Figura 4.8). Houve a formação de um grupo específico para cada localidade, confirmando-se duas áreas de coleta de sementes (Figura 4.9).

Figura 4.8 - Gráfico dos valores de ΔK , segundo correção de Evanno, Regnaut e Goudet (2005), mostrando o maior valor de ΔK para $k=2$.

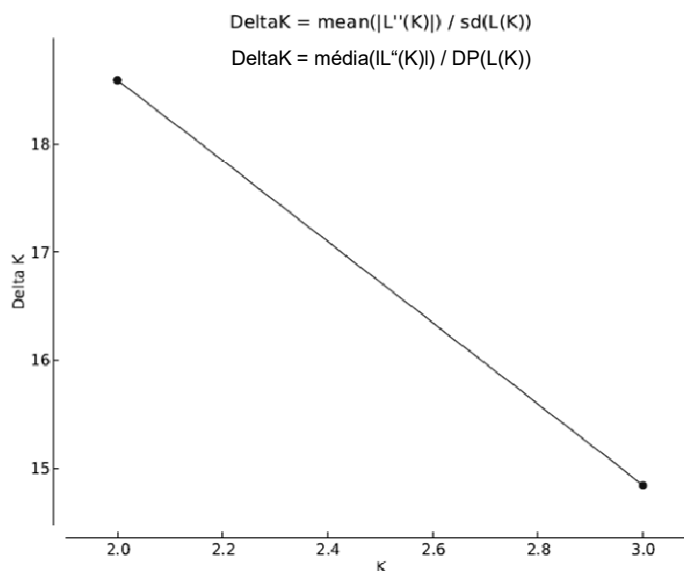
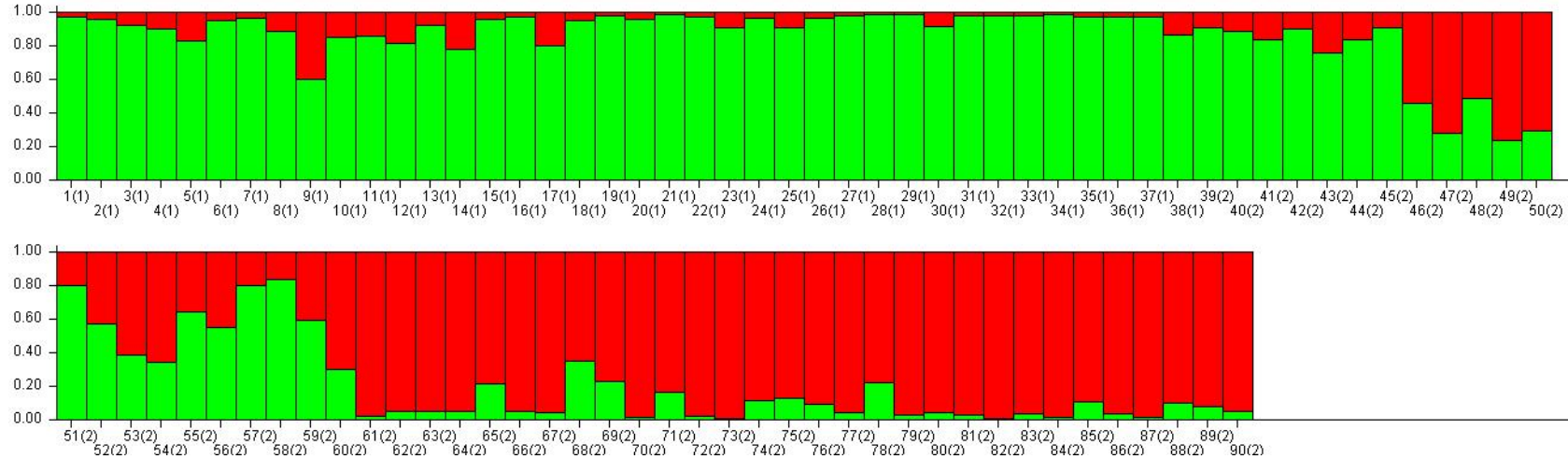


Figura 4.9 - Gráfico de barras obtido pela abordagem bayesiana por meio do software STRUCTURE onde são amostrados os dois grupos identificados pela análise (K= 2). Os números na horizontal correspondem aos 90 indivíduos de *D. nigra* estudados. Os números entre parênteses representam as procedências das sementes que originaram as matrizes no minijardim clonal, 1 – Viçosa, Minas Gerais e 2 – Linhares, Espírito Santo.



5. DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos *primers* ISSR

Os onze marcadores moleculares ISSR selecionados para a *D. nigra* foram eficientes na detecção da diversidade genética das populações amostradas. Esse tipo de marcador permite a identificação de ampla variabilidade intra e interpopulacional e, com isso, fundamentam-se como uma ferramenta bastante útil em programas de conservação e estudos de diversidade genética (LORENZONI et al., 2014). Na literatura, encontram-se diversos trabalhos utilizando marcadores dominantes (GONÇALVES et al., 2014b; LORENZONI et al., 2014; GIUSTINA et al., 2014; JÚNIOR et al., 2017; GIUSTINA et al., 2017; PASCHOA et al., 2018), inclusive os ISSR, os quais consideram a porcentagem de locos polimórficos como medida de diversidade genética.

A proporção de fragmentos polimórficos detectada para populações de *D. nigra* é considerada elevada, quando comparada aos resultados de estudos anteriores realizados. No trabalho de Souza et al. (2017) a diversidade genética entre genótipos de *Plathymentia reticulata* foi estimada utilizando dez *primers* ISSR, obtendo-se 156 fragmentos, sendo 101 polimórficos. Ramalho et al. (2016) em estudos com *Bertholletia excelsa* selecionaram oito *primers* ISSR, obtendo-se 52 fragmentos, sendo 46 polimórficos. Chagas et al. (2015) selecionaram, trabalhando com *Elaeis guineensis* 6 *primers*, os quais geraram, ao todo, 68 locos, sendo 34 polimórficos. Além disto, outros estudos têm revelado que é possível discriminar genótipos e populações com um número de locos variando entre 47 locos (DENDUANGBORIPANT et al., 2010) e 70 locos (BRANDÃO et al., 2011).

Segundo Gois et al. (2014) em análises genéticas utilizando marcadores dominantes, como os ISSR, o número de fragmentos amplificados e polimórficos utilizados para avaliar a diversidade genética vegetal, é bastante variável. Contudo, o número de iniciadores e a porcentagem de locos polimórficos encontrado para a espécie foram considerados suficientes para discriminar os genótipos e quantificar a variabilidade genética. Assim, a partir do número ótimo de marcadores obtidos (122), verifica-se que o valor do coeficiente de correlação se aproxima do valor máximo, o que confirma a consistência dos dados com o número de *primers* utilizados e o número de fragmentos obtidos, sendo suficientes para a representação da diversidade genética.

Para Colombo et al. (2000) o intervalo entre 50 a 100 bandas é considerado suficiente para estimar relações genéticas entre e dentro de espécies vegetais. O número ideal de bandas encontradas foi superior a este intervalo e os cálculos da diversidade executados foi a partir das 128 bandas polimórficas geradas, podendo inferir que as estimativas da diversidade genética entre os acessos apresentam excelente precisão.

Sobre o conteúdo de informação polimórfica (PIC), este por sua vez, auxilia na classificação dos marcadores moleculares conforme a eficiência na detecção de variabilidade entre os indivíduos, servindo de parâmetro para a seleção de iniciadores. De acordo com Botstein et al. (1980), o valor do PIC varia de 0 a 0,25 para marcadores considerados pouco informativos, de 0,25 a 0,5 para marcadores moderadamente informativos e acima de 0,5 para marcadores altamente informativos. Logo, no presente estudo, pode-se considerar que a eficiência dos *primers* em indicar polimorfismo entre os indivíduos é moderada.

5. 2 Diversidade Intrapopulacional

Verifica-se que houve grande distribuição dos genótipos em grupos diferentes, revelando ampla variabilidade genética entre os indivíduos, sem nenhuma evidência de indivíduos idênticos em termos genéticos, indicando que não há necessidade de descarte de genótipos duplicados e que todas as minicepas podem ser utilizadas como fontes de propágulos. Houve ainda, o arranjo de grupos isolados por um único genótipo, o que indica que tais indivíduos são os mais divergentes em relação aos demais.

Quando se deseja obter mudas com a máxima variabilidade genética para fins de recuperação ou restauração florestal, é importante priorizar a escolha daqueles indivíduos mais distintos geneticamente (SANTANA et al., 2008), uma vez que, a produção de mudas oriundas de matrizes aparentadas pode levar ao estreitamento da base genética, encadeando em futuras populações carregando baixa diversidade genética que por consequência, poderão ser mais vulneráveis a doenças e condições climáticas adversas.

O valor da correlação cofenética encontrado foi satisfatório, visto que valores superiores a 0,56 refletem boa concordância entre as matrizes (VAZ PATTO et al., 2004). De acordo com Cruz e Carneiro (2003), quanto maior o valor de CCC, menor

será a distorção provocada ao agrupar os indivíduos, o que normalmente é obtido pelo método da ligação média (UPGMA).

Para as estimativas da diversidade genética baseadas nos Índices de diversidade de Shannon (I) e de Nei (H) os resultados sugerem alta diversidade genética. Ao analisarmos as procedências separadamente, verifica-se que a maior riqueza ou variabilidade em termos de variação genotípica, é encontrada nas minicepas de Linhares e menor valor encontrado é relativo às minicepas de Viçosa. De acordo com Lewontin (1972) o valor do índice de Shannon pode variar entre 0 e 1, sendo 1 o ápice de diversidade de uma população; dessa forma, a população em estudo apresenta alto nível de diversidade genética.

Resultados condizentes aos encontrado por Souza et al. (2017), onde constataram alta diversidade genética nos indivíduos de *Plathymenia reticulata* presentes na área protegida da Floresta da Rosal, fundamentada nos valores de $H' = 0,380$ e $I = 0,548$. Vieira et al. (2018) objetivando caracterizar a diversidade de *Senefeldera verticillata* (Euphorbiaceae) em fragmentos de floresta estacional semidecidual, verificaram valores de diversidade genética em nível de espécie de $H' = 0,329$ e $I = 0,503$, considerados como níveis de diversidade relevantes.

Alta diversidade também foi encontrada em análises com *Schizolobium amazonicum* var. *amazonicum* (Huber ex. Ducke) Barneby, com valores de $H' = 0,375$ e $I = 0,554$ (JÚNIOR et al., 2017) e *Lecythis pisonis* Cambess com $H' = 0,311$ e $I = 0,473$ (BORGES et al., 2016).

Avaliando sob a ótica de seleção de minicepas para a coleta de propágulos, a existência de variabilidade genética significativa é de fundamental importância para garantir o vigor e resistência das mudas a serem obtidas. A caracterização genética é essencial não só para determinar genes úteis para possíveis avanços em futuros programas de melhoramento, mas para revelar se os genótipos são promissores e se as fontes de germoplasma são geneticamente diversas (MOURA et al., 2010; RÊGO et al., 2013).

Maior diversidade genética reforça a aptidão de organismos e aumenta a viabilidade da população (LEIMU et al., 2006; TAKKIS et al., 2013). Sem o acúmulo de diversidade genética, populações estabelecidas são vulneráveis aos efeitos de

procriação endogâmica e ao processo evolutivo estocástico da deriva genética, ameaçando a persistência a longo prazo das espécies (HOFFMANN; SGRO 2011).

Além disso, as condições ambientais alteradas, tais como clima e do uso da terra de alta intensidade, ameaçam a presença de muitas espécies, e a capacidade das populações de responderem a todas estas pressões, depende em grande medida da diversidade genética da população (BROQUET; PETIT, 2009; LOWE; ALLENDORF, 2010). Assim, restaurar a diversidade genética é um pré-requisito para o estabelecimento de populações viáveis resistentes a perturbações (RUIZ-JAEN; MITCHELL AIDE; 2005; BRUDVIG, 2011; WORTLEY et al., 2013; MIJANGOS et al., 2015).

Assim, a propagação de plantas geneticamente distintas é uma importante prática de conservação para espécies em vias de extinção. Espécies que apresentam potencial de propagação vegetativa, como a *D. nigra* sofrem menor efeito da deriva genética, uma vez que evita a perda de variabilidade genética na progênie através da clonagem de múltiplos indivíduos geneticamente distintos (FISCHER et al., 2000).

5. 3 Análises interpopulacional

A análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de *D. nigra* indicam moderada diferenciação genética ($\Phi_{ST} = 0,11847$), sendo verificada que a maior proporção da diversidade genética (88,15%) está dentro das populações. A elevada diferenciação genética entre populações de plantas é reflexo dos processos de fragmentação, isolamento das populações e distribuição geográfica (NYBOM; BARTISH, 2000). Outro fator que corrobora na análise da estruturação dessas populações foi a abordagem bayesiana e a estimativa de ΔK , indicando uma convergência para dois grupos bayesianos ($K=2$).

O valor do fluxo gênico histórico entre as procedências de *D. nigra* apontam baixo compartilhamento genético, claramente influenciado pela fragmentação existente e pela distância geográfica em que se encontram estes fragmentos, o que limita os agentes de dispersão de sementes e polens. Embora o valor da estimativa de fluxo gênico determine, que se o valor for maior que 1.0, o fluxo gênico será alto o suficiente para prevenir diferenciação por deriva (MORAES; DERBYSHIRE, 2002), ao se comparar com estudos com espécies arbóreas, o valor encontrado no presente estudo

é considerado baixo. Outros autores, que estudaram diversidade genética em populações naturais de espécies arbóreas, encontraram valores muito mais elevados para o fluxo gênico histórico, como Souza et al. (2017) que estudaram populações de *Plathymenia reticulata* e identificaram um fluxo gênico (Nm – número médio de migrantes por geração) de 12,70 e Vieira et al. (2018) o fluxo gênico encontrado de $Nm = 13,54$ para *Senefeldera verticillata*.

Considerando-se que a espécie arbórea é de ciclo de vida longo e encontra-se isolada em fragmentos, acredita-se que o fluxo gênico estimado reflita um acontecimento passado, quando as populações eram interligadas por florestas praticamente contínuas ou constituíam metapopulações, antes do processo de fragmentação da Mata Atlântica, provavelmente com maior número de indivíduos e manutenção do fluxo gênico (KAGEYAMA et al., 2003). Assim, os dados indicam que as populações das diferentes localidades, apesar da grande distância entre elas, apresentam alelos com frequências que podem ser similares, como resultado de trocas gênicas antigas (HAHN et al., 2012). Caso estas populações mantenham-se isoladas, espera-se que, no futuro, ocorra aumento nos níveis de diferenciação genética entre populações por deriva genética.

Rossi et al. (2014) citam ainda que o tempo de fragmentação pode explicar os valores de fluxo gênico. Os processos de fragmentação de populações naturais podem levar ao seu isolamento, diminuindo o fluxo gênico, podendo ocasionar a perda da diversidade genética e tornando populações mais distintas geneticamente de outras (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996).

6. CONCLUSÕES

Os marcadores ISSR utilizados para *D. nigra* foram eficientes na detecção de polimorfismos moleculares.

A população apresentou consistente estruturação e alta diversidade genética.

A maior riqueza em termos de variação genotípica é encontrada nas minicepas do Espírito Santo.

As populações de *D. nigra* apresentam moderada diferenciação genética, sendo verificada que a maior proporção da diversidade genética está dentro das populações.

As minicepas apresentam elevada diversidade e, portanto, revela potencial para serem utilizados como matrizes para coleta de propágulos na produção de mudas para fins conservacionistas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**, v. 11, n.2, p. 665-669, 2010.
- BORGES, R. C.; SANTOS, F. M. G.; MAIA, M. C. C.; LIMA, P. D. C.; VALENTE, S. E. S. Investigating genetic diversity in sapucaia using inter simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.
- BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p.957-964. 2011.
- BROQUET, T.; PETIT, E. J. Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.40, p. 193-216, 2009.
- BRUDVIG, L. A. The restoration of biodiversity: where has research been and where does it need to go? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 549-558, 2011.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa, 2003, 1039 p.
- CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. Perda e Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais. **Embrapa Algodão**. Documentos, 2009.
- CHAGAS, K. P. T.; ZOUSA, R. F.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p.147-152, 2015.
- CNCFlora. *Dalbergia nigra* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Dalbergia nigra](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Dalbergia_nigra)>. Acesso em 7 janeiro 2019.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2003, v.2. 585p.

CRUZ, C. D. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, p. 271-276, 2013.

DENDUANGBORIPANT, J.; SETAPHAN, S.; SUWANPRASART, W.; PANHA, S. Determination of local tobacco cultivars using ISSR molecular marker. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 37, n. 2, p.293-303, 2010.

DIAS, P. C.; DE OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-4, 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.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-49, 1992.

FISCHER, M.; HUSI, R.; PRATI, D.; PEINTINGER, M.; KLEUNEN, M.; SCHMID, B. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, v.87, n.8, p. 1128-1137, 2000.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Editora Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.

GIUSTINA, L. D.; LUZ, L. N.; VIEIRA, F. S.; ROSSI, F. S.; SOARES-LOPES, C. R. A.; PEREIRA, T. N. S.; ROSSI, A. A. B. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). **Genetics and molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3510-3519, 2014.

GIUSTINA, L.; ROSSI, A.; VIEIRA, F.; TARDIN, F.; NEVES, L.; PEREIRA, T. Variabilidade genética em genótipos de teca (*Tectona grandis* Linn. F.) baseada em marcadores moleculares ISSR e caracteres morfológicos. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 4, p. 1311-1324, out.-dez., 2017.

GOIS, I. B.; FERREIRA, R. A.; SILVA-MANN, R.; PANTALEÃO, S. M.; GOIS, C. B.; OLIVEIRA, R. S. C. Variabilidade genética em populações naturais de *Ziziphus joazeiro*

Mart., por meio de marcadores moleculares RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 4, p. 621-630, 2014.

GONÇALVES, E. D. O.; PAIVA, H. N. D.; NEVES, J. C. L.; KLIPPEL, V. H.; CALDEIRA, M. V. W. Growth of Jacaranda-da-Bahia (*Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr. All. ex Benth)) under different levels of NPK. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 3, p. 493 -500, 2014a.

GONÇALVES, L. O.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-MANN, R. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutin aWilld.*) em áreas de baixa ocorrência. **Revista de Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 290-298, 2014b.

HAHN, T.; KETTLE, C. J.; GHAZOUL, J.; FREI, E. R.; MATTER, P.; PLUESS, A. R. Patterns of genetic variation across altitude in three plant species of semi-dry grasslands. **PLoS ONE**, v. 15, p. 212-234, 2012.

HOFFMANN, A. A.; SGRÒ, C. M. . Climate change and evolutionary adaptation. **Nature**, v. 470, n. 7335, p. 479, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. **Dados meteorológicos**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 11/09/2018.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans une porion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles**, v. 37, p. 547-579, 1901.

JÚNIOR, A. S.; SOUZA, L. C.; PEREIRA, A. G.; CALDEIRA, M. V. W.; MIRANDA, F. D. Genetic diversity of *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex. Ducke) Barneby, in a forest area in Brazil. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 3, 2017.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 93-107, 2003.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.

LEIMU, R.; MUTIKAINEN, P.; KORICHEVA, J.; FISCHER, M. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? **Journal of Ecology**, v. 94, n. 5, p. 942-952, 2006.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, v. 6, p. 381-398, 1972.

LIMA, H. C. de 2015. *Dalbergia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22915>>. Acesso em: 10 de out de 2018.

LORENZONI, R. M.; SOARES, T. C. B.; SANTIAGO, V. F.; SILVA, J. A.; COELHO, R. I. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 251-257, 2014.

LOWE, W.; ALLENDORF, F. What can genetics tell us about population connectivity? **Molecular ecology**, v. 19, n. 15, p. 3038-3051, 2010.

McDERMOTT, J. M. E; McDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review Phytopathology**, v.31, p. 353-373, 1993.

MELO, A. T. O.; COELHO, A. S. G.; PEREIRA, M. F.; BLANCO, A. J. V.; Conservation genetics of *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.(Meliaceae) in atlantic forest fragments of Fernão Dias EPA. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 365-374, 2015.

MIJANGOS, J. L.; PACIONI, C.; SPENCER, P. B. S.; CRAIG, M. D. Contribution of genetics to ecological restoration. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 1, p. 22-37, 2015.

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, v. 50, n. 2, p. 159-179, 1985.

MOJEMA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977.

MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. **Biota Neotropical**, v. 2, n. 2, p. 1-19, 2002.

MORAES FILHO, R. M.; BONIFÁCIO-ANACLETO, F.; ALZATE-MARIN, A. L. Fragmentation effects and genetic diversity of the key semideciduous forest species *Metrodorea nigra* in Southwestern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 3509-3524, 2015.

MOURA, M. C. C. L; GONÇALVES, L. S. A; SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; PEREIRA, T. N. S. Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 155-161, 2010.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

NYBOM, H.; BARTISH, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in plant ecology, evolution and systematics**, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

PASCHOA, R. P. D.; CHRIST, J. A.; VALENTE, C. S.; FERREIRA, M. F. D. S.; MIRANDA, F. D. D.; GARBIN, M. L.; CARRIJO, T. T. Genetic diversity of populations of the dioecious *Myrsine coriacea* (Primulaceae) in the Atlantic Forest. **Acta Botânica Brasilica**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2 p. 945-959, 2000.

RAMALHO, A. B.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; ZORTÉA, K. É. M.; TIAGO, A. V.; MARTINS, K. C. Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**, v. 46, n. 2, p. 207-214, 2016.

RÊGO, E. R.; RÊGO, M. M.; FINGER, F. L.; NASCIMENTO, N. F. F.; NASCIMENTO, M. F.; SANTOS, R. M. C. Phenotypic Variability and Importance of Characters in a F2 Segregating Generation of Ornamental Chili (*Capsicum annuum*). **Acta Horticulturae** **1000**, p. 493-498, 2011.

RESENDE, L. C.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Diversity and genetic connectivity among populations of a threatened tree (*Dalbergia nigra*) in a recently fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetica**, v. 139, n. 9, p. 1159 - 1168, 2011.

ROLDÀN-RUIZ, I.; DENDAUW, J.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEPICKER, A.; DE LOOSE, M. A. F. L. P.. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, v. 6, n. 2, p.125-134, 2000.

ROSSI, F. S.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. D. F. E.; BRAUWERS, L. R.; DA SILVA, M. L.; SEBBENN, A. M. Genetic diversit in natural populations of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) using ISSR markers. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 104, p. 631-639, 2014.

RUIZ-JAEN, M. C.; AIDE, T. Restoration success: how is it being measured? **Restoration ecology**, v. 13, n. 3, p. 569-577, 2005.

SANTANA, G. C.; MANN, R. S.; FERREIRA, R. A., GOIS, I. B.; OLIVEIRA, S. A.; BOARI, A. J.; CARVALHO, S. V. A. Diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. no Baixo Rio São Francisco, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, p. 427-433, 2008.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES FILHO, W. S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

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

SOUZA, L. C.; JÚNIOR, A. L. S.; SOUZA, M. C.; KUNZ, S. H.; MIRANDA, F. D. Genetic diversity of *Plathymenia reticulata* Benth. in fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 3, 2017.

TAKKIS, K.; PÄRTEL, M.; SAAR, L.; HELM, A. Extinction debt in a common grassland species: immediate and delayed responses of plant and population fitness. **Plant ecology**, v. 214, n. 7, p. 953-963, 2013.

TIAGO, P. V.; ROSSI, A. A. B.; CARPEJANI, A. A.; TIAGO, A. V.; ROCHA, V. D. D.; FERNANDES, J. M.; SILVA, I. V. D. Genetic diversity and population structure of jatobá: a species with economic potential for the amazon region. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 2, p. 515-524, 2018.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v.137, n.1, p.63- 72, 2004.

VIEIRA, A. A. R.; JÚNIOR, A. S.; SOUZA, L. C.; MIRANDA, F. D.; FERREIRA, M. F. S.; CALDEIRA, M. V. W. Genetic structure and diversity of *Senefeldera verticillata* (Euphorbiaceae) in semideciduous seasonal forest fragments. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 3, 2018.

WORTLEY, L.; HERO, J. M., HOWES, M. Evaluating ecological restoration success: a review of the literature. **Restoration Ecology**, v. 21, n. 5, p. 537-543, 2013.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa, MG: SIF, 1998. 10 p.

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

YOUNG, A. G; BOYLE, T. J; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in ecology & evolution**, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.