

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**PROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Cabralea canjerana (VELL.) Mart.**

TESE DE DOUTORADO

Eliseo Salvatierra Gimenes

Santa Maria, RS, Brasil

2014

PROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart.

Eliseo Salvatierra Gimenes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal.**

Orientador: Dilson Antônio Bisognin, PhD

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gimenes, Eliseo Salvatierra
Propagação e diversidade genética de Cabralea
canjerana (VELL.) Mart. / Eliseo Salvatierra Gimenes.-
2014.
127 p.; 30cm

Orientador: Dilson Antônio Bisognin
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2014

1. Canjerana 2. Micropropagação 3. Microestaquia 4.
Miniestaquia. Mini jardim clonal 5. SSR I. Bisognin,
Dilson Antônio II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Eliseo Salvatierra Gimenes. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização escrita do autor.

Endereço: Rua dos Andradas 777/208, Centro, Santa Maria, RS, CEP: 97010-031
Email: eliseoiii@hotmail.com

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

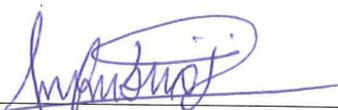
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Tese de Doutorado

PROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Cabralea canjerana*
(VELL.) MART.

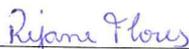
elaborada por
Eliseo Salvatierra Gimenes

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Florestal

Comissão Examinadora:



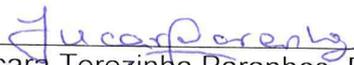
Dilson Antonio Bisognin, PhD
(Presidente/Orientador, UFSM)



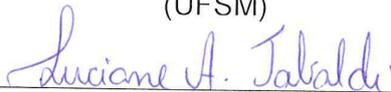
Rejane Flores, Dr^a.
(IF FARROUPILHA, Campus São Vicente do Sul)



Cleber Witt Saldanha, Dr.
(FEPAGRO FLORESTAS)



Juçara Terezinha Paranhos, Dr^a.
(UFSM)



Luciane Tabaldi, Dr^a.
(UFSM)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2014

A mi padre y gran incentivador,

Doctor en Educación,

Eliseo Salvatierra Jimenez

In Memoriam

*A minha mãe, Ignez,
pelo amor e exemplo.*

*A minha esposa Luciane
e a minha filha Samara,
pelo amor e paciência.*

*A mis Hermanos
Maria Amelia, Juan Antonio y Jose Agustin*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria por meio do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, Campus São Vicente do Sul, pelo apoio na realização do meu curso de Doutorado.

Ao Professor, Dilson Antônio Bisognin, PhD.; pela oportunidade, ensinamentos, e orientação ao longo destes quatro anos e pelo apoio fundamental para a realização do Doutorado Sanduíche na Michigan State University, o meu eterno muito obrigado.

À CAPES, pelo apoio financeiro na execução do Doutorado Sanduíche.

Aos Professores do PPGEF, Dr. Frederico Dimas Fleig e Dr^a. Maristela Machado Araújo, pela co-orientação e contribuições nos trabalhos realizados.

Aos Professores da Banca de Qualificação e de Defesa, Dr^a. Katia Zuffellato-Ribas, Dr^a. Rejane Flores, Dr^a. Juçara Paranhos, Dr. Cleber Witt Saldanha, Dr^a. Luciane Tabaldi e Dr. Nilton César Mantovani pela disponibilidade e contribuições para com este trabalho.

Agradecimento especial aos colegas do MPVP, UFSM; Kelen, Paula, Nathalia, Michele, Kenia, Carlise, Mauricio, Hardi, Marcelo, Ronilda e Uilian pela colaboração e contribuições nos trabalhos e experimentos realizados.

Ao Colega Eng^o Agr^o Evandro Missio, e em seu nome, aos funcionários da FEPAGRO FLORESTA, pelo apoio e colaboração na coleta dos frutos de canjerana.

Ao Professor, Dr. Daves Douches do Department of Plant, Soil and Microbial Sciences, da Michigan State University, pelo contato e pela oportunidade em poder participar do Doutorado Sanduíche nesta Instituição.

Ao Professor, Dr. James F. Hancock do Department of Horticulture, da Michigan State University, pela oportunidade, acolhimento, treinamento e orientação ao longo de um ano no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior da CAPES, e em especial ao Research Assistant Peter Callow (Pete), do Department of Horticulture da Michigan State University, pelo treinamento e apoio nas atividades laboratoriais e à campo.

Aos professores Dr. Guo-Quing Song e Dr. Daniel Keathley, do Department of Horticulture da Michigan State University, pelas contribuições nos trabalhos desenvolvidos e correções dos artigos.

Ao professor Dr. Suneth Sooriyapathirana do Department of Molecular Biology and Biotechnology da University of Peradeniya, Sri Lanka, pela orientação e contribuição na realização dos experimentos.

Aos Professores e colegas do PPGEF, UFSM e em especial aos colegas, Engenheiros Florestais, Emanuel Araújo, Gabriel Marangon e Jhon Jairo Zuluaga Peláez.

Cada uno a su tiempo...

(El Mundo es Ancho y Ajeno, Ciro Alegria, 1954).

Life is a test, life is a trust and life is a temporary assignment

(Rick Warren).

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

PROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart.

AUTOR: ELISEO SALVATIERRA GIMENES

ORIENTADOR: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Local e Data de Defesa: Santa Maria, 19 de dezembro de 2014.

A produção seminal de mudas de canjerana tem sido limitada pela dificuldade de germinação, ocasionada pelo comportamento recalcitrante das sementes. O objetivo deste trabalho foi desenvolver a micropropagação para auxiliar a conservação e multiplicação de genótipos superiores, estudar a microestaquia e miniestaquia para a produção massal de mudas, e avaliar a diversidade genética da canjerana. Na micropropagação, sementes de canjerana foram desinfetadas com 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% de hipoclorito de sódio para a produção de plantas assépticas e cultivadas em meios MS e WPM. Segmentos nodais das plântulas foram inoculados em meio WPM acrescido de 0 ou 2,5 μM de BAP, KIN ou TDZ, bem como acrescido de 0; 1; 3; 6; 9 e 12 μM de BAP. Microestacas foram cultivadas nos meios MS e WPM acrescido de 0 ou 5,0 μM de AIB e ANA. As microestacas enraizadas foram aclimatizadas em câmara úmida e em casa de vegetação. O maior percentual de sementes descontaminadas foi produzido usando uma solução de 7,5% de NaOCl por 10, 20 e 30 minutos. Tanto BAP, KIN e TDZ em iguais concentrações quanto o aumento das concentrações de BAP no meio WPM não aumentaram o número e nem comprimento das brotações. O meio de cultura e a auxina não afetaram a sobrevivência de microestacas, mas a adição de 5,0 μM de ANA aumentou a porcentagem de enraizamento e sobrevivência durante a aclimatização. Segmentos nodais e microcepas tiveram baixa taxa de multiplicação. Microestacas enraizaram em meio WPM ou MS acrescido de 5,0 μM de ANA. As mudas produzidas podem ser mantidas *in vitro* ou aclimatizadas para serem utilizadas como plantas matrizes do microjardim clonal. Para a produção de mudas de canjerana por miniestaquia foram avaliadas as concentrações de AIB e diferentes substratos. Miniestacas foram tratadas com 2000 mg L^{-1} de AIB e plantadas em substrato comercial; areia grossa; casca de arroz carbonizada; e a combinação em iguais proporções de substrato comercial, areia grossa e casca de arroz carbonizada. Miniestacas apicais e nodais foram tratados com 0; 1000; 2000 e 3000 mg L^{-1} de AIB e plantadas em uma combinação de substrato comercial, areia grossa e casca de arroz carbonizada. Além disso, a produtividade de minicepas e o enraizamento de miniestacas foram avaliados em três clones de canjerana. A combinação de substrato comercial, areia grossa e casca de arroz carbonizada maximizaram o enraizamento das miniestacas. Miniestacas nodais tiveram maior capacidade de enraizamento do que as apicais. A aplicação de 3000 mg L^{-1} de AIB aumentou o enraizamento e o crescimento de miniestacas de canjerana. Clones de canjerana diferem na porcentagem de enraizamento e na sobrevivência das miniestacas. A diversidade genética entre e dentro de progênies de três matrizes de canjerana foi avaliada por microsátélites. A

frequência alélica foi calculada para cada banda e a heterozigose e o conteúdo de informação polimórfica foram obtidos para cada par de primers, cada progênie e para a combinação dos 32 genótipos de canjerana. Os resultados indicam a existência de alta variabilidade genética, tanto entre quanto dentro das progênies avaliadas, possibilitando a formação de grupos com genótipos oriundos de diferentes progênies. Assim, alta variabilidade genética pode ser mantida a partir de clones de progênies de matrizes selecionadas.

Palavras-chave: Canjerana. Micropropagação. Microestaquia. Miniestaquia. Minijardim clonal. SSR.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

PROPAGATION AND GENETIC DIVERSITY OF *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart.

AUTHOR: ELISEO SALVATIERRA GIMENES

ADVISER: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Place and Date: Santa Maria, December 19th, 2014.

Seedling production of canjerana has been limited by difficulty in germination, caused by recalcitrant behavior of their seeds. The objective of this study was to develop micropropagation to auxiliate preserving and multiplication of superior genotypes, to study the plantlet production by micro-cutting and mini-cutting, and to evaluate the genetic diversity of canjerana. In micropropagation, seeds of canjerana were disinfected with 0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10% of NaOCl solution to produce aseptic seedlings, which were cultivated on MS and WPM media. Nodal segments were treated with 0 and 2.5 μM of BAP, KIN and TDZ and with 0, 1, 3, 6, 9 and 12 μM of BAP, which were cultivated on WPM media. Micro-cuttings, were cultivated on MS and WPM media with either 0 or 5.0 μM of IBA and NAA. The rooted micro-cuttings were acclimatized in a humid chamber in a greenhouse. The highest percentage of decontaminated seeds was produced using a solution of 7.5% of NaOCl and immersion times of 10, 20 and 30 minutes. The same concentrations of BAP, KIN and TDZ and increasing concentrations of BAP in the WPM media did not increase shoot number and length. Neither the base medium nor the auxin had a significant effect on the survival of micro-cuttings after 60 days of cultivation, but the addition of 5.0 μM of NAA did increase the percentage of rooting and survival during the acclimatization. Both nodal segments and microstumps of canjerana have a low rate of multiplication. Shoots produced from microstumps may be rooted in WPM or MS medium added with 5.0 μM of NAA. These complete plantlets can be maintained *in vitro* or acclimatized as a source of stock plants for the microclonal hedge. For production of canjerana plantlets by mini-cutting, different concentrations of indolbutyric acid (IBA) and substrate combinations were evaluated. Mini-cuttings were treated with 2000 mg L^{-1} of IBA and planted in commercial substrate; coarse sand; carbonized rice husks; and a combination of the three. Apical and nodal mini-cuttings were treated with 0, 1000, 2000 and 3000 mg L^{-1} of IBA and planted in a combination of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks. The productivity of microstumps and mini-cutting rooting were evaluated in three clones of canjerana. The combination of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks maximized mini-cuttings rooting. Nodal mini-cuttings had higher rooting capability than apical ones. The application of 3000 mg L^{-1} of IBA improved rooting differentiation and growth of canjerana mini-cuttings. Canjerana clones differ in rooting capability and survival rates. The genetic diversity of canjerana, within and among progenies of three stock plants, was assessed with previously defined species-specific SSR markers. The allele frequency was calculated for each band and the heterozygosity and the polymorphic information content were calculated for

each SSR pair of primers, progeny and for the combination of the 32 canjerana genotypes. The results showed high level of genetic diversity, both within and among progenies, making possible that genotypes from different stock plants grouped together. Based upon these results, high level of genetic diversity can be maintained in clones from progenies of selected stock plants.

Key words: Canjerana. Micropropagation. Micro-cutting. Mini-cutting. Miniclonal hedge. SSR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Árvore (A) e madeira (B) de canjerana, <i>Cabralea canjerana</i> , subsp. <i>canjerana</i> . Silveira Martins, 2012 (A) e UFSM, Santa Maria, RS (B).....	27
Figura 2 -	Inflorescências de canjerana, <i>Cabralea canjerana</i> . Frederico Westphalen, RS. 2007. Foto por Marciele Felippi.	29
Figura 3 -	Frutos de canjerana, <i>Cabralea canjerana</i> . MPVP, UFSM, 2012.....	30
Figura 4 -	Sementes de canjerana, <i>Cabralea canjerana</i> ; com arilo (A) e sem arilo (B). MPVP, UFSM, 2012.....	31
Figure 5 -	Percentages of disinfected seeds (A), rates of germination (B), percentages of normal seedlings (C), mean germination time (D), and the index of germination rate (IGR) (E) of canjerana seeds immersed in variant concentrations of NaOCl for different times. Santa Maria, RS, 2012/2013.....	59
Figure 6 -	Shoot number and length of nodal segments of canjerana cultivated in different concentrations of 6-benzylamine purine (BAP) for 60 days. Santa Maria, RS, 2013.....	63
Figure 7 -	Microstump with two micro-cuttings of <i>Cabralea canjerana</i> , cultivated <i>in vitro</i> . Santa Maria, RS, 2013.....	64
Figure 8 -	Rooted micro-cutting of canjerana, <i>Cabralea canjerana</i> , cultivated <i>in vitro</i> . Santa Maria, RS, 2012.....	65
Figure 9 -	Acclimatized microcutting of canjerana, <i>Cabralea canjerana</i> , cultivated in plastic pot with commercial substrate. Santa Maria, RS, 2012.....	66
Figure 10 -	Mini-cutting of canjerana <i>Cabralea canjerana</i> . Santa Maria, RS, 2012.....	74
Figure 11 -	Miniclonal hedge of canjerana, <i>Cabralea canjerana</i> (A), sprouts of a ministump (B), Santa Maria, RS, 2012/2013; and sketch of the miniclonal hedge in soilless system subirrigated with nutrient solution.....	75

Figure 12 -	Rooting percent (A) and number (NR) and length of roots (LR) (cm) (B) of mini-cuttings of canjerana treated with different concentrations of indolbutyric acid (IBA) after 60 days of cultivation. Santa Maria, RS, 2012/2013.....	80
Figure 13 -	Rooted mini-cuttings of canjerana, <i>Cabralea canjerana</i> , in different IBA concentrations. Santa Maria, RS, 2012/2013.....	81
Figure 14 -	Acclimatized and rooted mini-cutting from miniclonal hedge (A) and acclimatized plantlet (B) of canjerana, <i>Cabralea canjerana</i> . Santa Maria, RS, 2012.....	83
Figure 15 -	A silver stained polyacrylamide gel image for the SSR marker <i>Ccan11</i> , species specific DNA marker for <i>Cabralea canjerana</i> . L1: 100 bp ladder, L2: 50 bp ladder, 1 to 18 are 18 individual trees subjected to PCR analysis. MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.....	94
Figure 16 -	Dendrogram representing molecular similarity of 32 seedlings of canjerana from three different stock plants (SMSPP = Stock Plant 1, SiMSPP = Stock Plant 2 and ISPP = Stock Plant 3). MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.....	99

LISTA DE TABELAS

Table 1 -	Length of aerial parts, number of leaves and internodes, and total length of roots of canjerana seedlings cultivated in three culture media for 60 days. Santa Maria, RS, 2012.....	60
Table 2 -	Shoot number and length of apical, intermediate and basal segments of canjerana cultivated in two concentrations of 6-benzylamine purine (BAP) for 60 days. Santa Maria, RS, 2012.....	61
Table 3 -	Shoot number and length of nodal segments of canjerana cultivated with different cytokinins for 60 days. Santa Maria, RS, 2013.....	61
Table 4 -	Percentage of survival of microstumps and number of micro-cutting per microstump of canjerana cultivated in two culture media for 60 days. Santa Maria, RS, 2013.....	63
Table 5 -	Percentages of survival and rooting of canjerana micro-cuttings cultivated on two base medium, with or without two auxins after 60 days and the percentage of survival of rooted micro-cuttings after 30 days of acclimatization in a humid chamber in the greenhouse. Santa Maria, RS, 2012/2013.....	65
Table 6 -	Physical properties of the substrates used for the evaluation of the rooting capacity of canjerana. São Vicente do Sul, RS, 2013.....	76
Table 7 -	Percentage survival and rooting and number and length of roots of mini-cuttings of canjerana treated with 2000 mg L ⁻¹ of indolbutyric acid and grown in different substrates after 60 days of cultivation. Santa Maria, RS, 2012.....	77
Table 8 -	Percentage of survival and rooting and number and length of roots of apical and nodal canjerana mini-cuttings after 60 days of cultivation. Santa Maria, RS, 2012/2013.....	78
Table 9 -	Percentage survival and rooting and number and length of roots of mini-cuttings of canjerana treated or untreated with indolbutyric acid (IBA) after 60 days of cultivation. Santa Maria, RS, 2012/2013.....	78
Table 10 -	The average number of mini-cuttings (NM) and percentages of survival (S) and rooting (R) of mini-cuttings of canjerana harvested at three different harvested dates from ministumps formed from mini-cuttings that were rooted in a soilless system subirrigated with nutrient solution. Santa Maria, RS, 2012/2013...	82

Table 11 -	Sequences, size range and annealing temperatures of eight canjerana SSR pairs of primers. MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.....	92
Table 12 -	Abundance of allele and allelic frequency (Pi) for each allele and heterozygosity (H) and polymorphic information content (PIC) for each of the eight SSR pair of primers. MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.....	95
Table 13 -	Number of alleles, heterozygosity and polymorphic information content (PIC) for eight pairs of SSR primers in each progeny and combined genotypes of canjerana. MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.....	97

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 -	Resumo da análise de variância para a porcentagem de desinfestação de sementes de canjerana em função das combinações de concentrações (0; 2,5; 5; 7,5 e 10% NaOCl) e tempos de imersão (10; 20 e 30 min), avaliados aos 14 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de germinação.....	118
Apêndice 2 -	Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação de sementes de canjerana em função das combinações de concentrações (0; 2,5; 5; 7,5 e 10% NaOCl) e tempos de imersão (10; 20 e 30 min), avaliados aos 14 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de germinação.....	118
Apêndice 3 -	Resumo da análise de variância para a porcentagem de número de plântulas normais de canjerana em função das combinações de concentrações (0; 2,5; 5; 7,5 e 10% NaOCl) e tempos de imersão (10; 20 e 30 min), avaliados aos 14 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de germinação.....	118
Apêndice 4 -	Resumo da análise de variância para altura da planta de plantas de canjerana, avaliadas em meio nutritivo MS/2; MS e WPM aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	119
Apêndice 5 -	Resumo da análise de variância para número de folhas de plantas de canjerana, avaliadas em meio nutritivo MS/2; MS e WPM aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	119
Apêndice 6 -	Resumo da análise de variância para número de entrenós de plantas de canjerana, avaliadas em meio nutritivo MS/2; MS e WPM aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	119
Apêndice 7 -	Resumo da análise de variância para comprimento total das raízes de plantas de canjerana, avaliadas em meio nutritivo MS/2 ; MS e WPM aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	119
Apêndice 8 -	Resumo da análise de variância para número de brotos de segmentos oriundos da multiplicação de plantas de canjerana com 60 dias de idade, em função dos tipos de segmento e concentrações de BAP (0 e 2,5 μ M) e avaliadas em meio WPM aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	120
Apêndice 9 -	Resumo da análise de variância para comprimento de brotos de segmentos oriundos da multiplicação de plantas de canjerana com 60 dias de idade, em função dos tipos de segmento e concentrações de BAP (0 e 2,5 μ M) e avaliadas em meio WPM aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	120

Apêndice 10 -	Resumo da análise de variância para número de brotos de segmentos oriundos da multiplicação de plantas de canjerana com 60 dias de idade e avaliadas em meio WPM com 2,5 µM de BAP, KIN E TDZ aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	120
Apêndice 11 -	Resumo da análise de variância para comprimento de brotos de segmentos oriundos da multiplicação de plantas de canjerana com 60 dias de idade e avaliadas em meio WPM com 2,5 µM de BAP, KIN e TDZ aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	120
Apêndice 12 -	Resumo da análise de variância para o número de brotos de segmentos nodais de canjerana em função de diferentes concentrações (0; 1; 3; 6; 9 e 12 µM de BAP), avaliados aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura MS.....	121
Apêndice 13 -	Resumo da análise de variância para o comprimento de brotos de segmentos nodais de canjerana em função de diferentes concentrações (0; 1; 3; 6; 9 e 12 µM de BAP), avaliados aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura MS.....	121
Apêndice 14 -	Resumo da análise de variância para a sobrevivência de microcepas de canjerana, cultivadas em dois diferentes meios de cultura aos 60 dias de cultivo.....	121
Apêndice 15 -	Resumo da análise de variância para o número de microestacas de microcepas de canjerana, cultivadas em dois diferentes meios de cultura aos 60 dias de cultivo.....	121
Apêndice 16 -	Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas cultivadas em 4 diferentes tipos de substratos e oriundas de minicepas de canjerana e avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.....	122
Apêndice 17 -	Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas cultivadas em 4 diferentes tipos de substratos e oriundas de minicepas de canjerana e avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.....	122
Apêndice 18 -	Resumo da análise de variância para número de raízes de miniestacas cultivadas em 4 diferentes tipos de substratos e oriundas de minicepas de canjerana e avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.....	122

Apêndice 19 -	Resumo da análise de variância para comprimento de raízes de miniestacas cultivadas em 4 diferentes tipos de substratos e oriundas de minicepas de canjerana e avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.....	122
Apêndice 20 -	Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas oriundas de minicepas de canjerana em função dos tipos de segmento (apical e nodal) e concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 3000 mg L ⁻¹), avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.....	123
Apêndice 21 -	Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas oriundas de minicepas de canjerana em função dos tipos de segmento (apical e nodal) e concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 3000 mg L ⁻¹), avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.....	123
Apêndice 22 -	Resumo da análise de variância para número de raízes de miniestacas oriundas de minicepas de canjerana em função dos tipos de segmento (apical e nodal) e concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 3000 mg L ⁻¹), avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.....	123
Apêndice 23 -	Resumo da análise de variância para comprimento de raízes de miniestacas oriundas de minicepas de canjerana e em função dos tipos de segmento e concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 3000 mg L ⁻¹), avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.....	124
Apêndice 24 -	Resumo da análise de variância para número de miniestacas oriundas da primeira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.....	124
Apêndice 25 -	Resumo da análise de variância para número de miniestacas oriundas da segunda coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.....	124
Apêndice 26 -	Resumo da análise de variância para número de miniestacas oriundas da terceira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.....	124

Apêndice 27 -	Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas oriundas da primeira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.....	125
Apêndice 28 -	Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas oriundas da segunda coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.....	125
Apêndice 29-	Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas oriundas da terceira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.....	125
Apêndice 30 -	Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas oriundas da primeira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.....	125
Apêndice 31 -	Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas oriundas da segunda coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.....	126
Apêndice 32 -	Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas oriundas da terceira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.....	126

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Solução nutritiva original utilizada em estudo de produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate.....	127
Anexo B - Solução de micronutrientes para erva-mate, louro-pardo e canjerana.....	127
Anexo C - Solução nutritiva para erva-mate, louro-pardo e canjerana.....	127

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	24
1.1. Objetivos.....	26
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Descrição da espécie.....	27
2.2 Variabilidade genética.....	31
2.3 Melhoramento genético.....	33
2.4 Propagação vegetativa.....	35
2.4.1 Estaquia.....	35
2.4.2 Miniestaquia.....	36
2.4.3 Micropropagação.....	38
2.4.4 Microestaquia.....	40
2.5 Formação de jardim clonal.....	43
2.6 Enraizamento.....	44
2.6.1 Princípios anatômicos do enraizamento.....	46
2.6.2 Princípios fisiológicos do enraizamento.....	48
2.6.3 Fitoreguladores.....	49
2.6.4 Substrato.....	51
2.7 Aclimatização.....	52
3. CHAPTER I	
PROPAGATION <i>IN VITRO</i> AND MICRO-CUTTING OF <i>Cabralea canjerana</i>.....	53
Abstract	
3.1 Introduction.....	54
3.2 Material and methods.....	55
3.3 Results and discussion.....	58
3.4 Conclusion.....	66
3.5 References.....	67
4 CHAPTER II	
PROPAGATION OF <i>Cabralea canjerana</i> BY MINI-CUTTING.....	70

Abstract	
4.1 Introduction.....	71
4.2 Material and methods.....	73
4.3 Results and discussion.....	76
4.4 Conclusion.....	84
4.5 References.....	84
5. CHAPTER III	
GENETIC DIVERSITY WITHIN AND AMONG PROGENY OF	
<i>Cabrlea canjerana</i>.....	88
Abstract	
5.1 Introduction.....	89
5.2 Material and methods.....	91
5.3 Results and discussion.....	93
5.4 Conclusion.....	99
5.5 References.....	100
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
Apêndices.....	118
Anexos.....	127

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a produção florestal está concentrada no cultivo de espécies exóticas dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. Em 2013, a área ocupada por plantios florestais dessas espécies totalizou 6.664.812 ha, sendo 71% correspondente à área de plantios de eucalipto e 21,75% aos plantios de pinus (SFB, 2013). Com relação às pesquisas e ao desenvolvimento de tecnologias na silvicultura clonal, nota-se que, atualmente, os estudos estão direcionados quase que exclusivamente para a eucaliptocultura, com resultados aplicados intensivamente em diversas regiões do mundo (WENDLING e PINTO JUNIOR, 2011).

No atual cenário florestal brasileiro, há necessidade de propostas de propagação massal de espécies arbóreas nativas, visto que o novo código florestal estabelece a recuperação e a reposição florestal em áreas de preservação permanente, implicando na maior demanda de mudas para o plantio. Além disso, a meta governamental prevê, nos próximos dez anos, o estabelecimento de 200 mil hectares anuais com plantações de espécies nativas com fins comerciais (SFB, 2010). Nesse caso, a demanda anual de aproximadamente 400 milhões de mudas só poderá ser atendida com o uso da clonagem massal (HIGA, 2011).

Em espécies florestais nativas, o uso da propagação vegetativa se justifica para espécies que possuem dificuldades na produção de mudas via sementes e na obtenção das mesmas, de difícil armazenamento, com dormência ou baixo potencial germinativo (FERRARI et al., 2004). No entanto, existem dificuldades na propagação vegetativa, em nível de espécies e de genótipos, basicamente no que envolve a utilização de material adulto com pouca aptidão na formação de raízes. Em espécies lenhosas de difícil enraizamento, a habilidade na formação de raízes adventícias nos propágulos diminui com a passagem da fase juvenil para a fase adulta (idade ontogenética) da planta matriz. Em muitas destas espécies é a idade fisiológica ou ontogenética e não a idade cronológica do propágulo, que é o mais importante para o sucesso do enraizamento (HARTMANN et al., 2011).

A escolha da técnica de propagação vegetativa (e.g. estaquia, enxertia, microestaquia e miniestaquia) depende basicamente das características de reprodução das espécies e do propósito de uso. A técnica de micropropagação

trouxe grande expectativa para a produção de mudas de *Eucalyptus* spp., mas não se justificou técnica e economicamente, sendo mais recomendada com vistas ao rejuvenescimento de material adulto, por meio da microestaquia. Apesar disto, existem trabalhos de micropropagação e microestaquia com espécies arbóreas nativas, tais como abacateiro-do-mato (*Persea willdenovii* Kosterm) (FIOR et al., 2007), mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) (COSTA et al., 2010), erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) (HORBACH et al., 2011), louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell. Arrabida ex Steudel) (FICK et al., 2007), ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus* Mart. ex DC Mattos) (PAIM, 2011), ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus* Mart. ex DC Mattos) (MARTINS et al., 2011), e canjerana (*Cabralea canjerana* (VELL.) Mart.) (ROCHA et al., 2007).

No final da década de 90, a miniestaquia tornou-se uma técnica atraente na clonagem do eucalipto, uma vez que não necessita de estruturas de laboratórios e mão de obra especializada, reduzindo, portanto, o custo na produção das mudas (XAVIER e WENDLING, 1998). Alguns trabalhos mostram que a miniestaquia tem sido alternativa promissora para a propagação de espécies arbóreas nativas, com destaque para cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.) (XAVIER et al., 2003), erva-mate (WENDLING et al., 2007), corticeira-do-banhado (*Erythrina crista-galli* L.) (GRATIERI-SOSSELLA et al., 2008), corticeira-do-mato (*Erythrina falcata* Benth) (CUNHA et al., 2008), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) (LIMA et al., 2009), guanandi (*Calophyllum brasiliense*) (SILVA et al., 2010), leiteiro (*Sapium glandulatum* (VELL.) Pax.) (FERREIRA et al., 2010), liquidâmbar (*Liquidambar styraciflua*) (WENDLING et al., 2010) e angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) (DIAS et al., 2012).

Para a canjerana, espécie arbórea nativa pertencente à família Meliaceae, a produção de mudas via seminal tem sido limitada pela dificuldade de germinação, ocasionada pelo comportamento recalcitrante das sementes ao armazenamento (CARVALHO, 2006), podendo a propagação vegetativa ser alternativa para a produção massal de mudas. Entretanto, o uso dessa técnica para a produção de mudas tem sido pouco estudado, o que tem limitado o avanço silvicultural. Em trabalho utilizando rebrotas de segmentos nodais obtidas de plantas assépticas de canjerana, foi observado 87% de enraizamento das microestacas inoculadas em meio de cultura ½ MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de 5,0 µM de ácido

indolbutírico (AIB) (ROCHA et al., 2007), sendo esta a única referência que aborda o uso da propagação vegetativa para a produção de mudas de canjerana.

As tendências de aumento das pressões no sentido de buscar novas espécies para a silvicultura brasileira e, assim, a disponibilização de materiais genéticos dessas espécies, associado à carência de estudos que abordem a micropropagação de canjerana e a inexistência de referências sobre a sua propagação por miniestaquia, justificam a realização deste trabalho.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver a micropropagação para fornecer subsídios para a conservação e multiplicação de genótipos superiores, estudar a microestaquia e miniestaquia para a produção massal de mudas e avaliar a diversidade genética de canjerana.

Os objetivos específicos foram:

- Estabelecer *in vitro* plantas assépticas de canjerana;
- Avaliar a multiplicação e o enraizamento *in vitro* de canjerana;
- Avaliar o enraizamento de miniestacas provenientes de minijardim clonal, estabelecido em sistema de cultivo sem solo;
- Avaliar a aclimatização das plantas obtidas da microestaquia;
- Avaliar a diversidade genética entre e dentro de progênies de matrizes selecionadas de canjerana; e
- Iniciar e manter banco de germoplasma de plantas selecionadas para capacidade de enraizamento para desenvolver a produção massal de mudas de canjerana por microestaquia e miniestaquia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição da espécie

C. canjerana (VELL.) Mart. é espécie arbórea, perenifólia a caducifólia, popularmente conhecida por canjerana (Figura 1A), cedro-canjerana, caiarana, pau-de-santo, canharana, entre outros. Conforme o Sistema de Classificação Angiosperm Phylogeny Group (APG III), a taxonomia da canjerana obedece à seguinte hierarquia: grupo das Angiospermas, clado Malvídeas, ordem Sapindales, família Meliaceae (BREMER et al., 2009).

Canjerana é uma árvore, com 5 a 20 m de altura e com 20 a 50 cm de DAP (diâmetro à altura do peito), podendo alcançar até 35 m de altura e 230 cm de DAP na idade adulta (CASTIGLIONI, 1975). O fuste atinge até 13 m de comprimento (DURLO e DENARDI, 1998). Nos indivíduos maiores, adultos ou muito idosos, ocorre a presença de raízes tabulares proeminentes (CARVALHO, 2006). Esta espécie ocupa posição intermediária na floresta, raramente é dominante ou emergente. É árvore longeva, podendo ultrapassar 300 anos de idade (CARVALHO, 2006).



Figura 1 – Árvore de canjerana, *Cabralea canjerana*, subsp. *canjerana*. Silveira Martins, 2012 (A) e madeira (B) UFSM, Santa Maria, RS.

A espécie é pioneira (SOUSA-SILVA et al., 1999), secundária tardia (DURIGAN e NOGUEIRA, 1990; VACCARO et al., 1999) ou clímax tolerante à sombra (RONDON NETO et al., 1999), que pode ser encontrada na vegetação secundária, especialmente em capoeirões e na floresta secundária (COSTA e MANTOVANI, 1995). Sua faixa de ocorrência natural abrange a Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica), a Floresta de Tabuleiro, no norte do Espírito Santo (RIZZINI et al., 1997); a Floresta Ombrófila Densa (Floresta Amazônica), a Floresta Estacional Semidecidual, a Floresta Estacional Decidual (TABARELLI, 1992; VACCARO et al., 1999), a Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária) e os Campos de Altitude (GALVÃO et al., 1989; SILVA e MARCONI, 1990; CARVALHO, 2006). Caracteriza-se por ser uma espécie ombrófila na fase juvenil (GALVÃO, 1986) ou esciófila (ORTEGA, 1995). Em mata ciliar, a espécie suporta inundação (DURIGAN e NOGUEIRA, 1990). Para Sousa-Silva et al. (1999), a canjerana demonstra plasticidade suficiente para tolerar ambientes com variação de luminosidade, mas não tolera baixas temperaturas no estágio juvenil (CARVALHO, 2006).

A canjerana possui pronunciada agressividade sobre os capoeirões e matas secundárias no Sul do Brasil, demonstrando potencial de regeneração e de dinamismo nas associações secundárias, fato importante na silvicultura com espécies nativas (REITZ et al., 1988). Em pleno sol, a canjerana pode ser plantada em povoamentos mistos, associada com espécies pioneiras, em vegetação matricial arbórea ou na vegetação secundária. Após o corte, a espécie apresenta brotação vigorosa no colo, desenvolvendo troncos múltiplos (CARVALHO, 2006). Canjerana tem comportamento silvicultural superior ao do cedro, especialmente por apresentar maior durabilidade e ser menos danificada pela broca-dos-ponteiros (*Hypsipyla grandella* Zeller) (CARPANEZZI et al., 1988).

A canjerana fornece uma das madeiras mais valiosas do Sul do Brasil (Figura 1B), sobretudo por sua durabilidade quando exposta a intempéries e pela boa trabalhabilidade (REITZ et al., 1988; BACKES e IRGANG, 2002). A madeira é leve, apresentando massa específica aparente de, aproximadamente, 0,45 a 0,56 g cm⁻³ a 12% de umidade (PARANÁ, 1979) e moderadamente pesada (0,61 a 0,75 g cm⁻³) a 15% de umidade. A massa específica básica é de 0,55 g cm⁻³ (JANKOWSKY et al., 1990). A madeira é empregada em construções civis (indicada para obras internas e externas), dormentes, mourões, confecção de estruturas de móveis, marcenaria,

carpintaria, confecção de caixas, embalagens, esteios, cabos de vassoura e obras de escultura. A lenha produzida com esta espécie é de qualidade razoável (LONGHI, 1995; CARVALHO, 2006). A coloração da madeira varia de branca a vermelho-escuro, com reflexos nas faces radiais, textura média e lisa ao tato (CARVALHO, 2006). A casca do caule e das raízes apresenta propriedades medicinais purgativas, febrífugas, abortivas, antispépticas, adstringentes e eméticas, sendo comumente utilizados pela medicina popular na forma de infusão (CARVALHO, 2006).

A canjerana também permite a obtenção de outros produtos. O suco dos frutos tem ação inseticida. Da casca retira-se um corante vermelho utilizado em indústria de tinturaria (CARVALHO, 2006). Das flores é extraído perfume, matéria-prima para a indústria. Sakita e Vallilo (1990) detectaram a presença de óleos essenciais, saponinas e substâncias tanantes no seu lenho. Além disso, é recomendada para uso paisagístico, em virtude do aspecto atraente de suas folhas e frutos (SANCHOTENE, 1985). Entretanto, não deve ser usada em calçadas, por apresentar grande porte e sistema radicular superficial (CARVALHO, 2006).

As folhas da canjerana são compostas, alternas e imparipenadas (CARVALHO, 2006), com folíolos alternos, peciólulos de 3 mm de comprimento, lâminas oblongas, bordo inteiro, um quase reto e outro curvo e base assimétrica (REITZ et al., 1988). A floração (Figura 2) ocorre ao longo de todo ano, porém com maior intensidade durante os meses de setembro e outubro, com o surgimento de novas folhas.



Figura 2 – Inflorescências de canjerana, *Cabralea canjerana*. Frederico Westphalen, RS. 2007. Foto por Marciele Felippi.

Como consequência da floração, os frutos (cápsula “carnosa”) (Figura 3) também amadurecem em mais de uma época do ano, predominando no período de agosto a novembro (LORENZI, 2002). No Rio Grande do Sul, apresenta flores de fevereiro a março, frutificando de julho a dezembro (CARVALHO, 2006). A frutificação inicia-se aos três anos de idade em árvores plantadas em solos férteis, no Paraná (CARVALHO, 2006).



Figura 3 – Frutos de canjerana, *Cabralea canjerana*. MPVP, UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Uma característica dessa espécie é presença de flores e frutos maduros na mesma época (PENNINGTON et al., 1981). Apresentam inflorescências de tamanhos variados e flores com pedicelos curto bracteados, corolas e tubos estaminais brancas e amarelos, respectivamente. As flores podem ser bissexuais ou unissexuais (MOSCHETA et al., 2002). Carmo (2005) esclarece que o sistema sexual de canjerana é dióico. Moscheta et al. (2002) discutem se é possível identificar a diocia com base na morfologia floral, porém confirmam que em estudos anatômicos e principalmente sobre a função da flor, a diocia desta espécie é confirmada.

A dispersão dos frutos e sementes é zoocórica, sendo realizada, especialmente por aves, atraídas pela cor alaranjada do arilo (FRASSETTO e MENEZES, 1997). As sementes (Figura 4A) possuem um arilo suculento que as envolve, o qual é consumido por várias espécies de pássaros e macacos (BACKES e IRGANG, 2002), a exemplo do macaco-carvoeiro (*Brachyteles arachnoides*), sendo uma espécie útil e indispensável nos reflorestamentos heterogêneos ou restauração de áreas de preservação permanente (LORENZI, 2002). Os frutos são considerados maduros quando passam para a coloração avermelhada e são procurados por aves. Aqueles que abrem naturalmente apresentam maior germinação inicial (FRASSETTO e MENEZES, 1997).



Figura 4 – Sementes de canjerana, *Cabralea canjerana*; com arilo (A) e sem arilo (B). MPVP, UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

A época de dispersão de sementes da canjerana ocorre no período de chuvas, que favorece a germinação *in natura*, lembrando que as sementes desta espécie possuem comportamento recalcitrante, suportando poucos dias em solo seco (RIZZINI, 1977). Este processo é iniciado quando a semente é separada do fruto, sendo o seu poder germinativo diminuído após 10 dias (LONGHI et al., 1984). Em canteiros, a germinação de sementes desta espécie ocorre de 13 a 73 dias (BACKES e IRGANG, 2002). Quando removida a polpa do fruto, a germinação é de 78% e, quando mantida, observa-se a redução do poder germinativo (46%) (MARCHETTI, 1984). Lorenzi (2002) considera que a germinação é lenta e baixa, sem indicar o poder germinativo.

2.2 Variabilidade genética

No Brasil, a canjerana está representada por três subespécies: sendo *C. canjerana* subsp. *canjerana* (subespécie objeto deste estudo), *C. canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn. e *C. canjerana* subsp. *selloi* (C.D.C.) Barreiros. Essas subespécies divergem ecologicamente quanto aos nichos que ocupam, pois sua distribuição responde à tipologia de solos, formas de relevo, clima e proximidade de redes hidrográficas (PENNINGTON et al., 1981; BARREIROS e SOUZA, 1986). As subespécies *polytricha* e *selloi* apresentam porte arbustivo (de 3 a 6 m de altura), estando restritas às regiões continentais de climas quentes e secos. A subespécie *polytricha* parece estar restrita as áreas de cerrado e campo nos estados de Minas

Gerais e Goiás (PENNINGTON et al., 1981; BARREIROS e SOUZA, 1986). Pennington et al. (1981) menciona existir diferenças morfológicas entre a subsp. *canjerana* e a subsp. *polytricha*. A subsp. *canjerana* apresenta folíolos glabros na superfície inferior, com 10 a 15 cm de comprimento por 3 a 5 cm de largura e pétalas com 7 a 10 mm de comprimento; já a subsp. *polytricha* apresenta folíolos pubescentes na superfície inferior, com cerca de 5,5 cm de comprimento por 1,6 cm de largura e pétalas com 5 a 7 mm de comprimento (CARVALHO, 2006).

Na reserva ecológica do clube caça e pesca Itororó em Uberlândia (Minas Gerais), *C. canjerana* subsp. *polytricha* apresentou grande variabilidade genética para caracteres importantes na determinação do valor adaptativo, tais como altura da planta, massa fresca de frutos e sementes, número de sementes viáveis e densidade de plantas. Os diferentes genótipos modificam-se fenotipicamente de acordo com a heterogeneidade ambiental, o que assegura seu desenvolvimento em diferentes ambientes. Acredita-se que hajam ecótipos desta espécie, fato confirmado pela diferença significativa entre a altura das plantas e massa fresca dos frutos, em virtude da ocorrência de “trade-offs” (correlações genéticas negativas significativas) apontados pelas normas de reação. Além disso, *C. canjerana* subsp. *polytricha* apresenta considerável potencial plástico entre indivíduos relativamente próximos (FUZETO et al., 2001).

A plasticidade fenotípica trata da habilidade de um organismo alterar sua morfologia e/ou fisiologia em função de sua interação com o ambiente (SCHEINER, 1993). Quando uma espécie apresenta grande potencial de plasticidade em caracteres ligados à sobrevivência, esta apresenta vantagens adaptativas em ambientes instáveis, heterogêneos ou de transição, resultando em aumento da tolerância ambiental (VIA, 1993; VIA et al., 1995). Variações na forma e tamanho de folhas em plantas terrestres são exemplos clássicos de plasticidade fenotípica (BRADSHAW, 1965). Possivelmente está surgindo uma nova variedade ou subespécie de *C. canjerana* em áreas de vereda em Uberlândia, decorrente da plasticidade fenotípica dessa espécie (FUZETO et al., 2001).

É possível considerar a plasticidade fenotípica como um mecanismo gerador de variabilidade genética, uma vez que a seleção natural atua e modifica a frequência genotípica. Quando as divergências fenotípicas geradas dentro de uma população forem mantidas por seleção disruptiva, há favorecimento para o surgimento de subespécies, raças ou ecótipos (THOMPSON, 1991). A determinação

dos ecótipos, ou de sua eminente formação, é ferramenta importante para a preservação da variabilidade genética (LORTIE e AARSSSEN, 1996). Pode haver perda de parte da variabilidade genética de uma população caso áreas de preservação permanente, conservação e manejo da flora silvestre, determinadas pela avaliação do potencial plástico (BLACK et al., 1995), forem estabelecidas em áreas inferiores ao mínimo necessário para a manutenção de ecótipos, aparentemente não detectáveis fenotipicamente (PRENTICE et al., 1995).

Alguns trabalhos de melhoramento genético demonstram comportamento superior e variações acentuadas em crescimento entre as origens de *C. canjerana* subsp. *canjerana* plantadas pela Embrapa Florestas, destacando-se as das cidades de Cascavel e de Fênix, ambas no Estado do Paraná. Em plantios realizados em Santa Helena (Oeste do Paraná), observou-se a superioridade de crescimento em altura da cidade de Fênix (Norte do Paraná) sobre a de Santa Helena (CARVALHO, 2006).

2.3 Melhoramento genético

Tratando-se do melhoramento genético de espécies arbóreas, visando o estabelecimento de povoamentos com fins comerciais, a variabilidade genética possibilita o aumento da produção de madeira e subprodutos (PENCHEL, 2009). Em espécies arbóreas, as estratégias de melhoramento são, basicamente, a seleção na variabilidade existente entre os indivíduos da população. Para recombinação do material genético selecionado, bem como para dar continuidade à seleção recorrente, faz-se uso de áreas de coleta; produção de sementes ou pomares de sementes por mudas clonais. Testes de progênie convencionais são utilizados para a seleção dos indivíduos superiores. Já por via assexuada, o melhoramento é efetuado pelo enraizamento de estacas advindas de propágulos coletados de árvores selecionadas, muitas vezes híbridas, para a implantação de testes clonais e áreas de multiplicação clonal, fundamentais para a silvicultura clonal intensiva (FERREIRA, 1992).

A possibilidade de combinar sistemas de propagação sexual e assexual em plantas propagadas vegetativamente é importante para ampliar a base genética e o

desenvolvimento de novas cultivares. Diversas espécies são vegetativamente propagadas para explorar as vantagens da alta uniformidade e do alto vigor híbrido (BISOGNIN, 2011). A propagação vegetativa possibilita fixar características importantes, compostos químicos e interações de variância genética superior, além de manter altos níveis de heterozigose, característica que é necessária para o alto vigor híbrido (GLÉMIN et al., 2006). Entre as principais características da silvicultura clonal temos a uniformidade e maior qualidade dos plantios e de seus produtos; o aproveitamento de combinações genéticas raras, propagando novos híbridos. A maximização do ganho em produtividade e qualidade da madeira em uma única geração de seleção; a possibilidade de contornar problemas de doenças e adaptação fisiológica a estresses ambientais; a possibilidade de maior número de rotações operacionais economicamente viáveis, com custo acessível e competitivo para as empresas (PENCHEL, 2009).

De forma a complementar programas de melhoramento convencionais de espécies arbóreas e a identificação e obtenção de genótipos superiores, ferramentas biotecnológicas tais como o uso de marcadores moleculares, para avaliar o grau de variabilidade entre populações, tem sido usado com sucesso em programas de conservação de diversas espécies vegetais (VARSHNEY e ANIS, 2014). Os marcadores moleculares utilizados para estudos de diversidade genética são SSR (*simple sequence repeats*), também chamado de microsátélites (LITT e LUDY, 1989), devido a sua hipervariabilidade, abundância, e que junto com a reação de polimerização em cadeia (PCR), são um procedimento de diagnóstico relativamente simples (POWELL et al., 1996). Este tipo de marcador de DNA detecta altos níveis de variação alélica, é codominante, e é facilmente analisado via PCR (PEREIRA et al., 2011). Estes mesmos autores descreveram e desenvolveram 32 pares de microsátélites já testados e avaliados em um grupo de genótipos, os quais foram considerados como uma ferramenta valiosa para o estudo de populações de canjerana, incluindo estudos em diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico. Estes dados poderão ajudar na definição de estratégias de conservação e na elaboração de planos de manejo adequados em áreas de estudo como a Mata Atlântica (PEREIRA et al., 2011).

2.4 Propagação vegetativa

Propagação vegetativa ou reprodução assexual é a formação de novos indivíduos a partir de sucessivas mitoses em células ou tecidos vegetativos especializados (como bulbos, rizomas, tubérculos, estacas, gemas e sementes apomíticas) resultando em uma população clonal. Clone é definido como um material geneticamente uniforme proveniente de um único indivíduo que é propagado vegetativamente, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (HARTMANN et al., 2011). Em espécies que apresentam propagação via seminal limitada pela baixa produção de sementes ou pela dificuldade de germinação, a exemplo da canjerana, a propagação vegetativa pode ser a alternativa para a produção de mudas.

Diversas são as vantagens proporcionadas pelo uso da propagação vegetativa, dentre elas estão a fixação de genótipos selecionados, uniformidade de populações, facilidade de propagação, antecipação do período de florescimento, combinação de mais de um genótipo numa planta matriz e maior controle nas fases de desenvolvimento (HARTMANN et al., 2011). Dentre as principais técnicas comerciais usadas na propagação vegetativa em silvicultura a estaquia, a micropropagação, a microestaquia e a miniestaquia vem sendo aprimoradas por apresentar resultados importantes no melhoramento genético das espécies, além da formação de florestas comerciais mais homogêneas (XAVIER et al., 2009).

2.4.1 Estaquia

O princípio da propagação vegetativa por estaquia se baseia na possibilidade de regenerar uma planta a partir de uma porção de ramo (regeneração de ramos), ou de uma porção de raízes (regeneração de raízes). Desse modo, a partir de um segmento, é possível formar uma nova planta (FACHINELLO et al., 2005). Os segmentos utilizados são denominados estacas, podendo ser confeccionados a partir de ramos caulinares, raízes e folhas (HARTMANN et al., 2011).

O êxito da propagação via estaquia, vai depender de diversos fatores que estão relacionados ao enraizamento, variando para cada espécie, como também de

acordo com o tratamento subsequente. A facilidade ou não de enraizar é explicada pelo conhecimento dos fatores internos, como estágio fisiológico da planta matriz, balanço hormonal, juvenilidade e idade fisiológica ou ontogenética da planta matriz, e externos da estaca, como a época do ano, tipo de estaca, luz, temperatura e umidade (FERRARI et al., 2004; FACHINELLO et al., 2005).

A técnica da estaquia, por sua praticidade operacional, é amplamente empregada para a produção de mudas de espécies arbóreas selecionadas (FLORIANO, 2004). Também possibilita o resgate de plantas selecionadas visando a sua multiplicação e conservação. Porém, um dos maiores problemas relacionados à estaquia consiste no baixo potencial de enraizamento de propágulos advindos de plantas adultas e/ou a baixa qualidade do sistema radicular de alguns clones (ALFENAS et al., 2009; HARTMANN et al., 2011).

2.4.2 Miniestaquia

Essa técnica consiste na utilização de brotos emitidos de minicepas formadas pela decepa de plantas propagadas por sementes ou pela estaquia convencional (XAVIER e WENDLING, 1998; WENDLING et al., 2002). Na miniestaquia, faz-se a poda do caule da muda formada via seminal ou clonal que, em intervalos variáveis, em função da época do ano, do clone/espécie, das condições nutricionais, emitem novas brotações, as quais são coletadas e colocadas para enraizar e formar as futuras mudas clonais (WENDLING et al., 2002). A coleta de miniestacas nas minicepas deve ser realizada de forma seletiva, em períodos a serem definidos conforme o vigor dos brotos. Durante o preparo das miniestacas, estas devem ser acondicionadas em recipientes com água, para evitar estresse hídrico e a perda do seu turgor (XAVIER et al., 2009).

A técnica de miniestaquia vem sendo utilizada com sucesso na maximização do processo de propagação clonal em *Eucalyptus* spp., e surgiu a partir do aprimoramento da estaquia, visando contornar as dificuldades de enraizamento de alguns clones e também a partir das limitações da microestaquia (XAVIER e WENDLING, 1998). Segundo Wendling e Xavier (2003), existem trabalhos nos quais a miniestaquia seriada é utilizada como método de rejuvenescimento em

Eucalyptus spp. No rejuvenescimento de ramos, estacas oriundas de ramos com juvenildade tendem a apresentar um percentual maior de enraizamento (FACHINELLO et al., 2005). Assim, o uso da miniestaquia seriada pela rapidez no enraizamento e formação de mudas poderá ser um método alternativo promissor no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus* sp. (WENDLING e XAVIER, 2003).

Entre as vantagens da miniestaquia em relação à estaquia podem-se citar a redução da área necessária para formação do minijardim clonal, por localizar-se em bandejas no próprio viveiro; redução dos custos com transporte e coleta das brotações; maior eficiência das atividades de manejo (irrigação, nutrição, manutenções e controle de pragas e doenças), além de proporcionar maior qualidade, velocidade e percentual de enraizamento das miniestacas (HIGASHI et al., 2000; WENDLING e SOUZA JUNIOR, 2003).

Minijardim clonal é o conjunto de minicepas estabelecidas no viveiro, sob ambiente protegido, destinadas à produção de propágulos vegetativos (miniestacas) para o enraizamento (XAVIER e WENDLING, 1998; FERRARI et al., 2004). O minijardim pode ser implantado em sistema de recipientes, que variam desde vasos de polipropileno de diferentes volumes, caixas de fibra de vidro com variadas formas e dimensões, ou em sistemas de “canaletões” de fibro-cimento, contendo brita e areia grossa como substrato e comumente utilizado pelas grandes empresas florestais. Em se tratando dos canaletões, a fertirrigação deste sistema de cultivo sem solo é suprida por gotejamento e a solução excedente é drenada por orifícios no fundo do canaletão, que pode ser descartada (sistema aberto) ou retornar ao depósito (sistema fechado) (HIGASHI et al., 2000).

Alguns trabalhos em espécies florestais indicam boa adaptação ao sistema aberto de fertirrigação. Com erva-mate, Wendling et al. (2007) avaliaram a influência de três diferentes concentrações de solução nutritiva no enraizamento de miniestacas, sendo recomendada a solução mais diluída. O uso de fertirrigação em sistema aberto em vasos ou tubetes de polietileno com substrato tem se mostrado adequado para a formação de minijardim clonal de cedro rosa e espinheira santa, oriundas de minicepas de origem seminal (XAVIER et al., 2003; SOUZA JUNIOR et al., 2008).

O sistema fechado em bandejas de polipropileno com areia grossa como substrato e fertirrigação por inundação tem sido utilizado na miniestaquia e produção de minitubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.) (BANDINELLI, 2009). Este

mesmo sistema já foi adaptado com sucesso para a produção de plantas matrizes de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) (BISOGNIN, 2007) e para o enraizamento de miniestacas de louro-pardo oriundas de minicepas de origem assexuada, sem a necessidade de aplicação exógena de auxinas (KIELSE, 2012).

Alguns trabalhos com miniestaquia em espécies florestais nativas mostram resultados viáveis na sua produção comercial. Em corticeira-do-mato, a técnica permite a multiplicação de mudas a partir de material seminal e as mudas obtidas podem ser levadas a campo a partir de 4 a 5 meses de idade (CUNHA et al., 2008). Com cedro-rosa, é possível o uso da miniestaquia para a produção de mudas durante todo o ano (XAVIER et al., 2003). Para a canjerana, não há referências que abordem o uso da miniestaquia para a produção de mudas, sendo necessário o desenvolvimento de protocolos de condução e manejo de minijardim clonal, bem como de enraizamento de miniestacas.

2.4.3 Micropropagação

Na micropropagação, órgãos e tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas (HARTMANN et al., 2011). A micropropagação possibilita a produção massal de mudas com alta qualidade genética e sanitária, durante todo o ano, além de auxiliar a multiplicação de plantas a partir de sementes que possuem baixo poder germinativo (SINGH e SEHGAL, 1999; SERAFINI et al., 2001).

A micropropagação é importante para a produção de mudas de espécies de ciclo longo em um menor tempo e espaço físico (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). No entanto, a utilização dessa técnica envolve maiores investimentos quando comparada a propagação vegetativa convencional, pois é realizada em laboratório, necessitando de equipamentos, produtos e mão de obra especializada. Em clones de *Eucalyptus* sp. com dificuldades de enraizamento, a utilização da micropropagação para a obtenção de material rejuvenescido em laboratório tem sido limitada por aspectos técnicos, estruturais, operacionais e quanto ao custo da produção (XAVIER e WENDLING, 1998; ALFENAS et al., 2009).

A micropropagação pode ser dividida em fases, como: o estabelecimento *in vitro*, a multiplicação, o alongamento e enraizamento, e a transferência para casa de vegetação ou aclimatização (FACHINELLO, 2005; BARRUETO CID, 2010). No estabelecimento *in vitro*, diversos fatores podem afetar o potencial germinativo das sementes e promoverem a formação de plantas anormais, dentre os quais a presença de microorganismos, especialmente fungos e bactérias (MARTINS-CORDER e BORGES JUNIOR, 1999). Para que a planta formada a partir da germinação *in vitro* possa ser fonte de explante confiável, os métodos de desinfestação devem ser eficazes, proporcionando total ausência de agentes patogênicos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Entretanto, esta é uma etapa problemática da micropropagação, pois o desinfestante deve eliminar os microorganismos do tecido vegetal sem danificá-lo. Muitas vezes, a obtenção de tecidos vegetais livres de microorganismos é difícil, pois alguns patógenos podem ser endógenos ou estarem latentes, tanto nas sementes quanto nos explantes vegetativos. A desinfestação e germinação *in vitro* de sementes são utilizados para a obtenção de grande número de plantas. Apesar da infraestrutura adequada e mão de obra especializada, se comparado à propagação seminal convencional, é estratégia valiosa para garantir o aproveitamento de sementes disponíveis em pequenas quantidades, além de prevenir perda de sementes de frutos colhidos imaturos, como verificado em bapeba, *Pouteria venosa* (Mart.) Baehni quando 100% das sementes de frutos colhidos maduros e 55% das sementes de frutos colhidos imaturos germinaram *in vitro* (RODRIGUES et al., 1998).

A multiplicação consiste na indução de brotos nos explantes (segmentos nodais ou microestacas) obtidos de plantas ou microcepas mantidas em condições axênicas. Após a indução e alongação de brotos, estes são coletados e excisados para a obtenção dos explantes, os quais são subcultivados a cada duas a oito semanas em meio de cultura apropriado para a multiplicação (HARTMANN et al., 2011). Ao aumentar a concentração das citocininas é estimulada a brotação nos explantes, mas pode inibir a alongação.

Após a multiplicação, os explantes brotados são colocados para enraizar e formar novas plantas. O enraizamento pode ser realizado *in vitro* ou *ex vitro* (HARTMANN et al., 2011). No enraizamento *in vitro*, os explantes são transferidos para meio de cultura acrescido de auxinas, para que ocorram os processos de expansão, alongamento e divisão celular necessários para a formação de raízes

adventícias (TAIZ e ZEIGER, 2008). Após o período de permanência em meio de enraizamento, que é viável especialmente em função da espécie e do tipo de segmento, os explantes são subcultivados em meio de cultura livre de auxina.

A micropropagação também pode ser utilizada para a recuperação de plantas isentas de vírus (limpeza clonal), a conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), a obtenção de mutantes *in vitro*, a produção de haplóides e duplos haplóides e a produção de plantas transgênicas. Esta técnica tem sido muito utilizada na limpeza viral e na multiplicação de espécies ornamentais, hortícolas e frutíferas. Em espécies lenhosas, há destaque para a multiplicação de porta-enxertos de fruteiras de clima temperado e árvores-elite de essências florestais de rápido crescimento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Em espécies florestais nativas, são escassas as divulgações científicas quanto à eficiência da técnica da micropropagação e alguns estudos mencionam o seu uso como opção para a produção de mudas de abacateiro-do-mato (FIOR et al., 2007), mulungu (COSTA et al., 2010), erva-mate (HORBACH et al., 2011), louro-pardo (FICK et al., 2007), ipê-amarelo (PAIM, 2011) e ipê-roxo (MARTINS et al., 2011). Para a canjerana, estudos conduzidos por Rocha et al. (2007) foram desenvolvidos para o estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* bem como a aclimatização das plantas formadas, sendo essa a primeira menção que se tem conhecimento sobre o uso da micropropagação nessa espécie.

2.4.4 Microestaquia

A microestaquia é uma técnica de propagação assexuada, desenvolvida inicialmente em *Eucalyptus* sp. (ASSIS et al., 1992). Segundo Alfenas et al. (2009) microestaca é o propágulo vegetativo coletado de microcepas, com tamanho em torno de 7 a 8 cm e contendo de dois a três pares de folhas (ASSIS et al., 2004). São originados da poda drástica de plantas de origem assexuada, formada pela brotação e enraizamento de explantes *in vitro*. Tais plantas são denominadas microcepas, e seu conjunto denomina-se microjardim clonal. As microcepas estabelecidas *in vitro* são destinadas à produção de explantes, com vistas a

micropropagação e/ou rejuvenescimento prévio do material vegetativo com intuito de multiplicação em grande escala (ALFENAS et al., 2009).

A principal característica desta técnica é o uso de plantas rejuvenescidas, ou plantas rejuvenescidas *in vitro*, como fontes de propágulos vegetativos (ASSIS et al., 2004). O processo inicial para a produção de microestacas baseia-se no rejuvenescimento do material propagativo durante a micropropagação, para a retomada da capacidade de enraizamento, (SCHUCH et al., 2007) e o posterior enraizamento *ex vitro* com simultânea aclimatização (HARTMANN, et al., 2011). O rejuvenescimento ou revigoramento de tecidos adultos pode ser obtido via micropropagação por sucessivos subcultivos *in vitro* GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). De acordo com Alfenas et al. (2009), o rejuvenescimento ou pelo menos o restabelecimento da competência ao enraizamento é obtido, geralmente, após dez a doze subcultivos.

Em plantas de eucalipto a técnica da microestaquia foi empregada para explorar ao máximo a juvenilidade dos propágulos vegetativos e maximizar o enraizamento das microestacas no processo *in vitro* de propagação clonal (XAVIER et al., 2001). Com o uso da microestaquia na propagação clonal de *Eucalyptus grandis*, há uma melhor performance da técnica quando comparada com a miniestaquia, principalmente com clones de difícil enraizamento, obtendo-se maiores valores de enraizamento, taxas de sobrevivência, altura, diâmetro do colo e peso da massa seca de raízes (TITON et al., 2006). As microcepas, após a coleta de microestacas em eucalipto, brotam rapidamente, produzindo novos micropropágulos, os quais podem ser coletados em um período de quinze dias no verão e trinta dias no inverno em condições (ASSIS et al., 2004).

Dentre as vantagens apresentadas pela microestaquia em relação à técnica de estaquia convencional, podem-se destacar: maiores índices de enraizamento; redução do tempo de formação da muda no viveiro e dos investimentos em casa de vegetação, devido ao menor tempo de permanência para enraizamento; eliminação do jardim clonal de campo, disponibilizando a área para plantio comercial (IANELLI et al., 1996); melhor qualidade do sistema radicular (ASSIS, 1997); maior taxa de crescimento e sobrevivência das mudas no campo (XAVIER et al., 1997); e não-necessidade da aplicação de reguladores vegetais para enraizamento (XAVIER e COMÉRIO, 1996). No entanto, a microestaquia apresenta desvantagens e limitações, como maior sensibilidade das microestacas às condições ambientais e

dependência de laboratório de micropropagação para rejuvenescimento de material, onerando, assim, a produção de mudas, além de limitar sua utilização, em vista das dificuldades de rejuvenescimento de algumas espécies e até clones (ASSIS, 1997).

Segundo Dutra et al. (2009) a técnica da microestaquia apresenta custo elevado e a eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* é desejável do ponto de vista econômico, além de melhorar a qualidade do sistema radicial formado, uma vez que as raízes produzidas *in vitro* são consideradas frágeis e pouco funcionais, devido à incompleta conexão vascular entre a parte aérea e a raiz. O enraizamento *ex vitro* possibilita a obtenção de plantas com maior capacidade de emissão de raízes e maior velocidade de crescimento inicial, tendo em vista que as raízes desenvolvidas *in vitro* podem não ser funcionais e morrem após a transferência para aclimatização, sendo necessário induzir novas raízes após a passagem para as condições *ex vitro* (HARTMANN e al., 2011) Esse resultado mostra a eficiência da formação das raízes adventícias a partir de microestacas, em ambiente *ex vitro*, pois a formação de calo dificulta a conexão do sistema vascular entre caule e raiz (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Embora, tanto o enraizamento *in vitro* como *ex vitro* apresentaram perfeita conexão vascular entre as raízes adventícias e o câmbio vascular de *Eucalyptus benthamii* (BRONDANI et al., 2012).

Em estudo com *Lavandula angustifolia*, o enraizamento *ex vitro* com a utilização de microestacas de 4,0 cm de comprimento proporcionou maior enraizamento e sobrevivência das microestacas e a concentração de 5,0 mM ($1016,5 \text{ mg L}^{-1}$) de AIB aplicada via solução na base das microestacas foi eficiente para a indução de raízes adventícias em microestacas, de 2,0 cm e 4,0 cm de comprimento, bem como favoreceu a sobrevivência das plantas (MACHADO et al., 2013).

A microestaquia têm sido utilizada para a propagação de algumas espécies florestais nativas. Segundo Ferrari et al. (2004) esta técnica utiliza propágulos (microestacas) rejuvenescidas em laboratório para serem posteriormente enraizados, visando a obtenção de mudas. Apesar disso, são escassas as divulgações científicas quanto à eficiência da microestaquia para a propagação dessas espécies. Alguns estudos apontam a microestaquia como opção para a produção de mudas de abacateiro-do-mato (FIOR et al., 2007), louro-pardo (FICK et al., 2007) e mulungu (COSTA et al., 2010).

2.5 Formação de jardim clonal

As cepas de árvore selecionada, banco clonal ou jardim clonal, é o local onde é efetuada a propagação clonal por estaquia, a partir do enraizamento de estacas caulinares (segmentos de 6 a 10 cm de tamanho com um par de folhas reduzidas pela metade), confeccionadas a partir de brotações. Esta tem sido a forma mais aplicada, pois permite um manejo intensivo e ajustado para obtenção de brotações, destinados ao enraizamento das miniestacas. A frequência das coletas no jardim clonal varia, em média, de 15 a 45 dias, cujo período irá depender da espécie, do clone, do ambiente e da metodologia de coleta (ALFENAS et al., 2009, XAVIER et al., 2009). Dentre as desvantagens do jardim clonal estão a maior suscetibilidade as variações ambientais (SILVA, 2001); a necessidade de mão de obra qualificada; o maior controle sobre as atividades de manejo, planejamento e produção das mudas (XAVIER e WENDLING, 1998).

As técnicas da microestaquia e da miniestaquia têm possibilitado a substituição dos jardins clonais de campo para viveiros. Dentre as principais vantagens dessa tecnologia destacam-se o menor envolvimento de mão de obra (ASSIS, 1996); redução em investimentos em casa de vegetação, em razão da maior rapidez de enraizamento; eliminação do jardim clonal de campo, disponibilizando a área para plantios comerciais (XAVIER e COMÉRIO, 1996); e controle mais efetivo de pragas, doenças, fertilização e da irrigação, resultando em melhoria da qualidade das mudas (HIGASHI et al., 2000; SILVA, 2001).

No laboratório de cultura de tecidos, a micropropagação de espécies e híbridos de eucalipto faz parte do processo de produção de mudas em algumas empresas florestais. Normalmente, as mudas obtidas por micropropagação são mantidas em condições *in vitro* por questões estratégicas, no caso de material vegetal superior, ou servem para abastecer o mini ou microjardim clonal (DUTRA et al., 2009). Na micropropagação, os ápices caulinares são usados como microestacas, os quais são colocados para enraizamento em casa de vegetação de vidro equipada com controle de temperatura e umidade (ASSIS et al., 2004).

Segundo Assis (1996) e Xavier e Comério (1996) o microjardim clonal, em casa de vegetação, localiza-se em tubetes sobre mesas metálicas ou bandejas no viveiro, o que permite o melhor manejo e controle. O microjardim clonal, constituído

por microcepas, é o fornecedor de propágulos vegetativos (microestacas) para o processo de produção de mudas, que é dependente das estruturas da casa de vegetação, casa de sombra e área de pleno sol, onde são realizadas as fases de enraizamento, aclimatação e rustificação das mudas, respectivamente (CARVALHO e SILVA, 2012).

2.6 Enraizamento

A propagação por microestaquia e miniestaquia é influenciada por diversos fatores intrínsecos à planta matriz e ao ambiente. Entre os fatores internos, citam-se a espécie, as características genéticas e a idade fisiológica ou ontogenética da planta matriz, o estágio fisiológico dos propágulos, o teor de hidratos de carbono, nitrogênio, fitoreguladores e água disponível nos tecidos. Entre os fatores ambientais destacam-se a umidade relativa do ar, temperatura, luminosidade, composição do substrato, concentração de CO₂ do ambiente de enraizamento e sanidade das estacas (FERRARI et al., 2004; FLORIANO, 2004).

Quanto maior o grau de maturidade do material vegetativo, menor será a capacidade de enraizar, refletindo na formação de plantas com baixo vigor e com menor desenvolvimento a campo (FERRARI et al., 2004). A maturidade do propágulo está diretamente relacionada, entre outros fatores, à origem genética da planta matriz e a idade cronológica (que se refere ao tempo decorrido desde a germinação da semente até a data da observação), fisiológica (que se refere aos aspectos negativos da idade, tais como a perda de vigor, o aumento da susceptibilidade às condições adversas ou a deterioração em geral) e ontogenética (passagem da planta por sucessivas fases de desenvolvimento desde a embriogênese, germinação, crescimento vegetativo e reprodutivo e senescência) (WENDLING e XAVIER, 2001). Portanto, plantas matrizes jovens fornecem propágulos mais responsivos ao enraizamento se comparados àqueles provenientes de plantas adultas (idade cronológica). Isso se deve ao fato de que a maioria das plantas arbóreas sofrem mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas na transição da fase juvenil para a adulta, as quais afetam a competência para o enraizamento, o vigor de crescimento e a resistência às pragas e doenças,

dificultando a propagação vegetativa à medida que aumenta a idade da planta matriz (WENDLING e XAVIER, 2001). A posição de coleta dos propágulos na planta matriz também influencia o enraizamento, de modo que a maior juvenilidade da região basal das plantas (idade ontogenética) se deve ao fato de que os meristemas mais próximos da base formaram-se em épocas mais próximas à germinação que o das regiões terminais (HARTMANN et al., 2011).

Inúmeras substâncias naturais e sintéticas têm sido utilizadas para induzir o enraizamento. Substâncias promotoras do enraizamento podem ser adicionadas ao meio de cultura ou aplicadas nas estacas por meio de contato ou imersão em solução. Diversas classes de fitoreguladores, tais como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e inibidores, como o ácido abscísico e compostos fenólicos, na iniciação de raízes. Entre elas, a auxina é a que tem o maior efeito sobre a formação de raízes em estacas (TAIZ e ZEIGER, 2008; HARTMANN et al., 2011). As auxinas são sintetizadas no meristema apical e nas folhas novas, fluindo para a base do caule por transporte basípeto, ou sintetizadas no ápice radicular, sendo translocadas para a planta por transporte acrópeto (TAIZ e ZEIGER, 2008). Em algumas espécies, as estacas possuem substâncias naturais em quantidades suficientes para induzir o enraizamento. Além disso, a planta pode produzir substâncias indutoras do enraizamento quando submetidas à injúria mecânica, no momento do preparo das estacas (SIMÃO, 1998).

Na microestaquia e miniestaquia as raízes adventícias podem advir de qualquer tipo de tecido. Algumas espécies já possuem os primórdios radiculares antes do corte (HIGASHI et al., 2000). Assim, o enraizamento tem origem no grupo de células próximas ao corte que retornam às suas funções meristemáticas, convertendo-se em primórdios radiciais (HARTMANN et al., 2011).

O enraizamento adventício é influenciado pela nutrição mineral. O estado nutricional da planta matriz que fornece os propágulos para a o enraizamento é fator determinante do sucesso da propagação vegetativa, pois determinará a quantidade de carboidratos, auxinas, entre outros compostos metabólicos, fundamentais à indução e ao crescimento das raízes (CUNHA et al., 2009). Alguns trabalhos com espécies florestais nativas mostram que o enraizamento pode ocorrer sem o uso de AIB. Em leitero, *S. glandulatum* (VELL.) Pax. foi observado que a miniestaquia realizada nas quatro estações do ano é viável para a formação de raízes adventícias, dispensando a utilização de AIB e ANA, sendo a estação do inverno a

mais favorável para o enraizamento (FERREIRA et al., 2010). Em guanandi (*C. brasiliense*) foram testados os níveis de 0, 2000, 4000 e 8000 mg L⁻¹ de AIB e todos os tratamentos resultaram em enraizamento maior que 85%, indicando que não há necessidade de tratamento auxínico (SILVA et al., 2010). Em estudo de miniestaquia de angico-vermelho, *A. macrocarpa* (Benth) Brenan, o enraizamento das miniestacas não foi favorecido com o uso de 2000, 4000 e 6000 mg L⁻¹ de AIB (DIAS et al., 2012). Entretanto, para outras espécies o uso de AIB é necessário. Em corticeira-do-banhado (*E. crista-galli* L.), as miniestacas coletadas de plantas jovens com menos de um ano de idade, são as mais indicadas para a propagação e o uso de AIB a partir de 1000 mg L⁻¹ pode reduzir a mortalidade e favorecer o enraizamento (GRATIERI-SOSELLA et al., 2008).

Já no enraizamento *ex vitro*, a base dos explantes é tratada com auxina, na forma líquida ou em pó, sendo os cultivos realizados em substrato esterilizado e mantidos em câmara úmida (HARTMANN et al., 2011). O enraizamento *ex vitro* apresenta algumas vantagens em relação ao enraizamento *in vitro*, destacando-se o menor estresse das plantas ao serem transferidas para a fase de aclimatização e redução da mão de obra, já que não é necessário o subcultivo de explantes para meio de cultura livre de auxina. Os protocolos incluem a rápida imersão dos explantes em auxina e, após cultivados em substrato, os explantes permanecem sob condição de alta umidade em câmara úmida. Outro tratamento consiste na imersão da base dos explantes em meio de cultura composto apenas por ágar e auxina por 5 a 15 dias. Após, os explantes são lavados em água destilada para a retirada do ágar e cultivados em substrato (HARTMANN et al., 2011).

2.6.1 Princípios anatômicos do enraizamento

Na propagação vegetativa, o sistema radicular formado é denominado adventício, pois a raiz se desenvolve através do tecido adulto, não do tecido embrional ou meristemático (FERREIRA, 1992). Para que ocorra a formação de raízes adventícias, as células vegetais devem apresentar a capacidade de desdiferenciação e totipotência. Desdiferenciação é o processo no qual células de um tecido já diferenciado retornam à atividade meristemática e originam um novo

ponto de crescimento, e totipotência, a capacidade de uma célula originar um novo indivíduo, uma vez que contém toda a informação genética necessária para reconstituir todas as partes de uma planta e suas funções (TAIZ e ZEIGER, 2008).

A formação de raízes adventícias é geralmente uma resposta ao dano causado com a preparação do material propagativo. Quando as células vivas das superfícies cortadas são danificadas e os feixes do xilema expostos, inicia-se a cicatrização e regeneração, conforme as seguintes fases: 1) após morte das células externas danificadas ocorre processo de suberificação e tamponamento do xilema, a fim de evitar a dessecação e a entrada de patógenos; 2) as células vivas localizadas sob a placa suberificada iniciam processo de divisão, formando uma camada de células de parênquima conhecida como calo; e 3) a formação das novas raízes adventícias em células próximas ao câmbio vascular e floema (HARTMANN et al., 2011).

As mudanças no desenvolvimento que ocorre na formação de raízes adventícias podem, geralmente, ser divididas em quatro estádios: 1) desdiferenciação de células especificamente diferenciadas (células adultas), 2) formação de células iniciais de raízes próximas aos feixes vasculares ou tecido vascular, que tornou-se meristemático pela desdiferenciação, 3) desenvolvimento de células iniciais de raízes em primórdios radiciais organizados, e 4) crescimento e emergência dos primórdios radiciais através do córtex e epiderme da estaca, acompanhando o sentido do sistema vascular da estaca (FERRI, 1985). Em estacas herbáceas, que não possuem um câmbio desenvolvido, os primórdios podem surgir entre os feixes vasculares ou paralelos a estes, emergindo em filas, acompanhando os feixes vasculares. As raízes adventícias também podem ser formadas a partir da epiderme e do periciclo (FACHINELLO et al., 2005).

As raízes adventícias podem originar-se de tecidos de gemas dormentes do câmbio, gemas próximas de ramos danificados ou mortos, regiões cambiais e liberinas dos tecidos do raio, parênquima de arranjo irregular, tecidos de ramos e folhas, tecidos cicatricial e meristema primário. As plantas de difícil enraizamento, geralmente, não possuem primórdios radiciais nos tecidos normais. Nestas, as raízes se originam de tecidos cicatriciais que se desenvolvem por divisão do câmbio e do parênquima liberiano, ou ainda, de qualquer célula viva que não tenha desenvolvido sua parede secundária (ESAÚ, 1976).

A iniciação de raízes laterais (ramificadas) e raízes adventícias é estimulada por altos níveis de auxina. As raízes laterais são normalmente encontradas acima da zona de alongamento e pilífera, originando-se pequenos grupos de células no periciclo. A auxina estimula as células do periciclo a se dividirem. As células em divisão gradualmente formam o ápice radicular e a raiz lateral cresce através do córtex e da epiderme da raiz (TAIZ e ZEIGER, 2008).

2.6.2 Princípios fisiológicos do enraizamento

As principais condições fisiológicas da planta matriz são a presença de carboidratos, substâncias nitrogenadas, aminoácidos, auxinas, compostos fenólicos e outras substâncias não identificadas, o período e posição de coleta das estacas, juvenildade, estiolamento, presença de folhas e gemas, idade da planta matriz e fatores do ambiente, como disponibilidade de água, luminosidade e substrato (HARTMANN et al., 2011). A capacidade de enraizamento é em função de fatores endógenos à planta matriz e das condições ambientais proporcionadas durante o enraizamento (FACHINELLO et al., 2005). Portanto, é necessário que um novo sistema de raízes adventícias se desenvolva, já que o explante normalmente possui gemas com aptidão e potencial para desenvolver novos brotos (HARTMANN et al., 2011).

A formação de raízes adventícias deve-se a interação de fatores existentes nos tecidos e à translocação de substâncias localizadas nas folhas e gemas (FACHINELLO et al., 2005). Esse efeito correlato é o controle de um órgão sobre o desenvolvimento de outro, o qual é mediado por fitoreguladores (HARTMANN et al., 2011). As folhas e gemas produzem auxina, sendo o efeito observado na base do explante, o qual é importante na subsequente formação radicular (FACHINELLO et al., 2005), além de serem responsáveis pela síntese de cofatores e carboidratos (FERRI, 1985), favorecendo a formação de raízes adventícias.

2.6.3 Fitoreguladores

Os fitoreguladores tem sido apontados como fatores determinantes ao enraizamento adventício (FACHINELLO et al., 2005). As auxinas, as citocininas, as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico atuam de forma direta ou indireta na formação de raízes em estacas (TAIZ e ZEIGER, 2008). O fitoregulador com melhor resultado na formação de novos brotos adventícios *in vitro* é a citocinina (BARRUETO CID, 2010; HARTMANN et al., 2011). As citocininas são normalmente sintetizadas no próprio sistema radicular e translocadas pelo xilema para outras partes da planta (TAIZ e ZEIGER, 2008). Uma alta razão auxina:citocinina no cultivo *in vitro* estimula a formação de raízes enquanto uma baixa razão leva a formação de parte aérea (TAIZ e ZEIGER, 2008).

Na fase de multiplicação, a adição de citocininas ao meio de cultura *in vitro* pode influenciar a taxa de multiplicação e a alongação dos brotos. Já na planta toda, as citocininas atuam em diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento incluindo a divisão celular, morfogênese da parte aérea e das raízes e senescência (TAIZ e ZEIGER, 2008). No grupo das citocininas encontram-se a 6-benzilaminopurina (BAP), a cinetina (KIN) e o thidiazuron (TDZ), este último atua tanto como citocinina ou auxina (BARRUETO CID, 2010).

As plantas podem ser divididas em três classes com relação aos efeitos do fitoregulador sobre o enraizamento: 1) fáceis de enraizar, sendo plantas que possuem auxinas e todos os cofatores que agem em células embrionárias na determinação das formas e quando os explantes são preparadas e colocadas sob condições ambientais adequadas, o que resulta em uma rápida formação radicular. Neste tipo de planta, a auxina favorecerá o aumento do enraizamento, mas geralmente não é requerida; 2) moderadamente fácil de enraizar, sendo plantas nas quais os cofatores ocorrem amplamente de forma natural, mas a auxina é limitada e necessária para aumentar o enraizamento; e 3) difíceis de enraizar, sendo plantas com falta de cofatores ou com falta de células sensíveis para responder a estes elementos, mesmo que a auxina natural esteja ou não presente em abundância, a aplicação externa de auxina proporciona pouca ou nenhuma resposta ao enraizamento (HARTMANN et al., 2011).

As auxinas tem o maior efeito na formação radicular (HARTMANN et al., 2011). Entre as principais auxinas naturais, está o ácido indol acético (AIA) (HARTMANN et al., 2011). Na cultura de tecidos, as auxinas são frequentemente usadas na indução de calos a partir de um explante e no enraizamento a partir de brotos. São exemplos de auxina o AIA, o AIB, o ácido naftalenoacético (ANA), o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-picolínico (PICLORAM) (BARRUETO CID, 2010).

Os ápices radiculares produzem pouca auxina, porém não há acumulação nas raízes devido ao elevado teor de substâncias inativadoras de auxina nesta parte da planta (FACHINELLO et al., 2005). A inativação do AIA nas plantas é causada por processos fotoquímicos ou enzimáticos que degradam a molécula de AIA, ou mediante reações enzimáticas que ligam a molécula de AIA a outras moléculas, produzindo compostos geralmente inativos. Esse processo enzimático que inativa o AIA de maneira oxidativa é conhecido como o sistema AIA-oxidase. Vários são os produtos de degradação, sendo conhecidos ácidos indolilcarboxílicos, 3-metilenoxindol, ácido oxindolacético; entre outros (TAIZ e ZEIGER, 2008). Dentre as hipóteses envolvendo o mecanismo de ação das auxinas, os ácidos nucleicos e proteínas também devem estar relacionados com modificações na parede celular, através da secreção de íons de hidrogênio e estimulação da atividade enzimática, capaz de promover afrouxamento e alongação da parede celular (CASTRO, 1979). Um possível receptor da auxina é a proteína ABP1, localizada no lume do retículo endoplasmático (TAIZ e ZEIGER, 2008).

Há espécies que necessitam da aplicação de reguladores vegetais, para auxiliar a formação de raízes nas estacas, sendo o AIB uma auxina comumente utilizada para essa finalidade. A quantidade de auxina utilizada para o tratamento das estacas varia de 20 a 10.000 mg L⁻¹, sendo as maiores concentrações utilizadas para estacas mais lenhosas. A aplicação de AIB pode ser feita na forma de pó, misturado com talco ou na forma líquida, dissolvida em álcool etílico a 50%, acrescentando-se ainda água para completar a concentração desejada (WENDLING et al., 2002).

2.6.4 Substrato

Para a escolha adequada do substrato destinado ao enraizamento devem-se levar em consideração fatores econômicos, como a disponibilidade, qualidade e facilidade de manuseio; fatores químicos, relacionados principalmente ao pH e a condutividade (nível de fertilidade do material); e fatores físicos, se referindo às características desejáveis do próprio material, como textura e densidade, que interferem na aeração, capacidade de retenção de umidade e agregação do substrato (WENDLING et al., 2002; HARTMANN et al., 2011).

Para a produção de mudas de espécies florestais são utilizados principalmente o composto orgânico, esterco bovino, terra de subsolo, vermicomposto e o composto de resíduos sólidos urbanos (PAIVA e GONÇALVES, 2001). Entretanto, não existe formulação definida para as diferentes espécies florestais. A adição de 20 a 40% do material poroso (casca de arroz carbonizada, fibra de coco, acículas de pinus, composto, etc.) é recomendável na composição do substrato para diferentes espécies e para diferentes condições de propagação (WENDLING e GATTO, 2002). No Rio Grande do Sul, a casca de arroz carbonizada é amplamente utilizada, como forma de aumentar a porosidade dos substratos. É um resíduo facilmente disponível (KÄMPF e JUNG, 1991), apresentando baixa densidade e peso específico, além de lenta biodegradação, permanecendo na forma original por longos períodos de tempo (WENDLING et al., 2002).

O substrato tem um papel fundamental no crescimento e enraizamento dos propágulos, mantendo-os em posição vertical e como meio de suprimento da demanda por água e nutrientes. O melhor substrato é usualmente composto de uma variedade de diferentes materiais que atendam estas funções físicas e que facilitem o crescimento e a resposta ao estímulo hormonal, assim como prover a disponibilidade dos assimilados necessários para o enraizamento e vigor (SMART et al., 2003). Substratos com espaço de aeração de 30%, com porosidade total de 85% e água disponível entre 24 e 40% foram considerados como as condições ideais para a produção de mudas seminais (SCHIMITZ et al., 2002). Em trabalho com espinheira-santa, o enraizamento de miniestacas cultivadas em substrato areia (92,04%), casca de arroz carbonizada (88,66%) e Plantmax HT[®] (94,31%)

apresentaram índices significativamente superiores à vermiculita (78,41%) (LIMA et al., 2009).

2.7 Aclimatização

É o processo pelo qual plantas produzidas sob condições controladas *in vitro*, são transferidas gradualmente para um ambiente com condições climáticas naturais, e com o objetivo de diminuir a possibilidade de estresse ou até mesmo à morte (BRAINERD e FUCHIMGAMI, 1981). O sucesso da micropropagação depende da aclimatização, ou seja, da gradual transferência de plantas produzidas *in vitro* para a condição *ex vitro* (HARTMANN et al., 2011), já que a maior limitação na aplicação desta técnica em grande escala se encontra na alta mortalidade das plantas micropropagadas durante ou após a transferência para o solo (CHANDRA et al., 2010).

Na aclimatização de miniestacas, estas são colocadas para enraizamento em câmara úmida dentro de casa de vegetação com umidade relativa acima de 80%, seguindo posteriormente para a casa de sombra, para uma pré-adaptação às condições de menor umidade relativa e, finalmente, transferidas para pleno sol para rustificação e posterior plantio. O período de permanência das miniestacas ou plantas em cada uma dessas etapas dependerá da época do ano, do clone e ou espécie envolvida e do seu estado nutricional (WENDLING et al., 2002).

As plantas ao serem transferidas para a condição *ex vitro* são expostas a fatores abióticos (alteração da temperatura, intensidade da luz e condições de umidade) e condições de estresse biótico, ou seja, microflora do solo, o que pode comprometer o vigor das plantas e que acarreta no aumento da mortalidade durante a aclimatização, o estabelecimento e a sobrevivência em ambiente natural (DEB e INCHEN, 2010).

3 CHAPTER I

PROPAGATION *IN VITRO* AND MICRO-CUTTING OF *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart.

Abstract

Cabralea canjerana (VELL.) Mart. is a tree species indigenous to many countries in South America, with a great importance for forest regeneration programs and the local farm economies. The objective of this study was to develop an efficient protocol to micropropagate canjerana seeds of selected individuals, as a tool for preserving and producing plantlets of superior genotypes for field evaluations and breeding new cultivars. Seeds of canjerana were disinfected with 0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10% of NaOCl solution to produce aseptic seedlings, which were cultivated in MS and WPM media. Nodal segments were treated with 0 and 2.5 μM of BAP, KIN and TDZ and with 0, 1, 3, 6, 9 and 12 μM of BAP, which were cultivated in WPM media. Micro-cuttings, were cultivated in MS and WPM media with either 0 or 5.0 μM of IBA and NAA. The rooted micro-cuttings were acclimatized in a humid chamber in a greenhouse. The highest percentage of decontaminated shoots was produced using a solution of 7.5% of NaOCl and immersion times of 10, 20 and 30 minutes. BAP, KIN and TDZ in the WPM media did not increase shoot number and length, nor did increasing concentrations of BAP in the WPM medium. Neither the base medium nor the auxin had a significant effect on the survival of micro-cuttings after 60 days of cultivation, but the addition of 5.0 μM of NAA did increase the percentage of rooting and survival during the acclimatization. Both nodal segments and microstumps of canjerana have a low rate of multiplication. Micro-cuttings produced from microstumps may be rooted in WPM or MS medium added with 5.0 μM of NAA. These complete plantlets can be maintained *in vitro* or acclimatized as a source of stock plants for a microclonal hedge.

3.1 Introduction

To complement conventional tree breeding programs, three specific biotechnological techniques have been successfully used, namely: tissue culture, for *in vitro* propagation and conservation, molecular markers, to assess the genetic diversity within and between populations, and encapsulation and cryopreservation, for long-term conservation (VARSHNEY and ANIS, 2014). Among these techniques, tissue culture is an appealing approach for conservation, because it aids the propagation of species with limited numbers of explants, low seed yield due to inbreeding depression (HENDRIX and KYHL, 2000), complex and unresolved seed dormancy mechanisms (MERRITT and DIXON, 2003; MERRITT et al., 2007), and poor seed set and viability due to environmental stresses, such as drought, predation, and/or disease (VARSHNEY and ANIS, 2014). Micropropagation allows the *in vitro* conservation and plantlet production of selected genotypes at any time for a microclonal hedge, that consisted of microstumps from micropropagated plantlets produced by *in vitro* subcultures (SIVARAJAN et al., 2014), and the miniclinal hedge that consist of rooted mini-cuttings from conventional cutting method-derived sprouts (SIVARAJAN et al., 2014), and can be derived from seedlings, cuttings or micropropagation (microstumps) (FERRIANI et al., 2010). Plantlets produced through micropropagation have the advantages of high genetic and phytosanitary quality and physiological juvenility, which allows for the production of mini-cuttings with high competence for rooting (VARSHNEY and ANIS, 2014). Therefore, the advantages of micropropagation are that heterozygous materials may be perpetuated without genetic alteration; it is easier and faster than producing seedlings; the dormancy problem is eliminated; and the new plantlets have a reduced juvenile stage. It is also a means for perpetuating genotypes that do not produce viable seeds or any seeds at all (VARSHNEY and ANIS, 2014).

Canjerana is an important native tree species in many countries of South America. Its seeds are difficult to store, having a drastic reduction in germination after 15 days of processing (removing their impurities) (GRUNENVALDT et al., 2014). In this case, micropropagation would be a useful approach for conservation and multiplication of superior genotypes.

Micropropagated plants are highly desirable as microclonal hedge material for micro-cutting production. Usually, stock plants for a clonal hedge come from conventional cutting or mini-cutting derived plantlets referred as miniclonal hedge and from micropropagated plantlets, referred as microclonal hedge (FERRIANI et al., 2010, SIVARAJAN et al., 2014). Indeed, mini-cutting is one of the latest vegetative propagation techniques used for mass production of woody species plantlets (HARTMANN et al., 2011). Micropropagation and micro-cutting of native trees has been accomplished in Brazil with *C. trichotoma* (FICK et al., 2007), canjerana (ROCHA et al., 2007), *I. paraguariensis* (HORBACH et al., 2011) and *H. impetiginous* (Mart. ex DC Mattos) (MARTINS et al., 2011), and in USA with *L. styraciflua* (L.) (DURKOVIC and LUX, 2010), *Sequoia sempervirens* (D Don Endl.) (OZUDOGRU et al., 2011), and *Quercus alba* (L.) (VIEITZ et al., 2012). Combining conventional breeding with biotechnological techniques enables the identification and multiplication of superior genotypes, necessary for forest production (HAGGMAN et al., 2014).

The objective was to study micropropagation and micro-cutting of canjerana from seeds and of selected individuals, as a tool for preserving and producing plantlets of superior genotypes for field evaluations and breeding new cultivars.

3.2 Material and methods

The study was carried out in the laboratories and greenhouses of the Center for Plant Breeding and Vegetative Propagation, Department of Plant Science, Federal University of Santa Maria, Brazil. We carried out eight experiments, including seed disinfection and germination, *in vitro* multiplication and rooting, and acclimatization in the greenhouse. To start the process, fruits of canjerana were collected from stock plants, packed in a sealed plastic bag and stored in a cool and dry environment until they dehisced (ROCHA et al., 2007). Seeds were extracted when the fruits first opened, and immediately pre-disinfected with a solution of 2.5% (v/v) of sodium hypochlorite (NaOCl) (Alpha Química) and rinsed three times with distilled water.

The laboratory experiments were carried out in flasks, containing the culture medium, capped with aluminum foil and maintained in a growth chamber held at about $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 16 hour days of artificial light from white fluorescent lamps. For *in vitro* germination, one seed was planted in one flask (15 mL) containing 5 mL of autoclaved culture medium, at pH 5.8, capped with aluminum foil. All other *in vitro* experiments were carried out with one explant (seedling, shoot segment or microstump) planted in one flask (150 mL) containing 40 mL of culture medium, with the pH adjusted to 5.8, capped with aluminum foil and autoclaved for 20 min at 1 atm. For *in vitro* establishment, the seeds of canjerana were first washed with distilled H_2O in a sterilized metallic sieve before removing the aril. Subsequently, seeds were immersed in a 0; 2.5; 5.0; 7.5; and 10% (v/v) solution of NaOCl (Alpha Química, 10-12% v/v), with one drop of Tween20[®] (Belga Química) per 100 mL of distilled water for 10, 20 and 30 min and rinsed three times with sterile-distilled water. The 0% concentration had only one drop of Tween20[®] per 100 mL of distilled water. The culture medium was 30 g L^{-1} of sucrose and 6 g L^{-1} of agar (Vetec[®]). The experiment was a factorial 5×3 (NaOCl concentrations and immersion times) in a complete random design with eight replications of five seeds. Every three days we counted the number of germinated seeds with visible radicles, to calculate the mean germination time (MGT) and the index of germination rate (IGR). $\text{MGT} = (N_1T_1 + N_2T_2 + \dots + N_nT_n) / (N_1 + N_2 + \dots + N_n)$, and $\text{IGR} = (N_1/T_1 + N_1/T_2 + \dots + N_n/T_n)$, where N is the number of germinated seeds on a particular day and T is the time in days (FICK et al., 2007). Thirty days after inoculation, we also determined the percentage of seeds that were free of fungi and/or bacteria, the percentage germination rate and the proportion of normal seedlings.

Aseptic seedlings of canjerana were cultivated in three different culture media, MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962), 1/2 MS (MS with half concentration of minerals and vitamins), and WPM (LLOYD and MC COWN, 1981), with 30 g L^{-1} of sucrose and 6 g L^{-1} of agar. The experiment was set up as a complete random design with four replications of four seedlings. The plant height, number of leaves and internodes and total length of roots were evaluated 60 days after seedling cultivation.

Aseptic seedlings of canjerana were also used as source of explants for multiplication. The nodal segments were separated as basal, intermediate and apical, with 0.5 to 1.0 cm in length and one axillary bud, were planted in WPM medium

added with 0 or 2.5 μM of 6-benzylamine purine (BAP) (Vetec[®]), 30 g L⁻¹ of sucrose and 6 g L⁻¹ of agar. The experiment was set up as a factorial 2 x 3 (level of BAP and source of segments) in a complete random design with five replications of four nodal segments. Shoot number and length (cm) were evaluated after 60 days of cultivation.

Due to the lower number of intermediate segments produced in the multiplication stage, basal and intermediate nodal segments with 0.5 to 1.0 cm in length and one axillary bud were used to study the effect of different cytokinin and BAP concentrations on the micropropagation of canjerana. In one experiment, nodal segments were planted in WPM medium containing 2.5 μM of BAP, kinetin (KIN) (Vetec[®]), or thidiazuron (TDZ) (Vetec[®]) and with 30 g L⁻¹ of sucrose and 6 g L⁻¹ of agar. In another experiment, nodal segments of canjerana were planted in WPM medium containing 0; 1; 3; 6; 9; or 12 μM of BAP, 30 g L⁻¹ of sucrose and 6 g L⁻¹ of agar. Both experiments were carried out as a complete random design model with eight replications of six nodal segments. Shoot number and length (cm) were evaluated after 60 days of cultivation.

After excising the nodal segments, from the previous experiments, the root system and the rest of the aerial part of the seedlings (microstumps) were transferred to MS or WPM base medium with 30 g L⁻¹ of sucrose and 6 g L⁻¹ of agar. The experiment was a complete random design with eight replications of six microstumps. The percentage of microstump survival and the number of micro-cuttings produced per microstump were evaluated at 60 days of cultivation.

The rooting capability of the micro-cuttings was evaluated in MS or WPM basal media, with 0 μM , 5.0 μM of indolebutyric acid (IBA) (Vetec[®]), or 5.0 μM of naftalen acetic acid (NAA) (Vetec[®]), plus 30 g L⁻¹ of sucrose and 6 g L⁻¹ of agar. The micro-cuttings were one to two cm in length and had two leaves. The experimental design was a factorial 2 x 3 (base media and auxin concentrations) in a complete random design with five replications of four micro-cuttings. The percentage of rooting was evaluated after 60 days of cultivation.

The rooted micro-cuttings from the three culture media were planted in plastic pots containing 150 cm³ of a commercial substrate (organic pine bark base, H. Decker Company, Rio do Sul, Santa Catarina, Brazil) for acclimatization. The pots were placed in the shade under a bench for a week and irrigated twice a day. The pots were then placed on the top of the bench and irrigated once a day in a greenhouse, with a mean temperature of 22°C and 50% of shade. The experimental

design was a complete random design with five replications of four rooted micro-cuttings. The percentage of survival was evaluated after 30 days of acclimatization.

Data were submitted to analysis of variance and for those variables with significant differences ($p \leq 0.05$), treatment means were compared by Tukey test or polynomial regression, as appropriate. For purposes of analysis, percentage data were transformed to $\arcsin\sqrt{x/100}$ and counting data to $\sqrt{x+0.5}$ to attend the statistical presuppositions. All analysis were done with the ESTAT (UNESP - Jaboticabal) program.

3.3 Results and discussion

The analysis of variance showed a significant interaction ($p \leq 0.05$) between concentrations of NaOCl and immersion times for the percentage of disinfected seeds and germination rates. Seeds treated with 7.5% of NaOCl for 30 minutes had more than 80% uninfected seeds and more than 90% germination (Figure 5A and 5B). The percentage of disinfected seeds and seedling vigor (time to germination) was more strongly associated with the concentration of NaOCl than the immersion time (Figure 5A). The highest level of disinfection and germination was observed with the concentration of 7.5% of NaOCl for the three immersion times (Figure 5B). In addition, the highest percentage of disinfection (Figure 5A) was significantly associated with the highest vigor (lowest mean germination time) (Figure 5D), the highest IGR (index of germination rate) (Figure 5E) and the percentage of normal seedlings (Figure 5C) when seeds were treated with 7.5% of NaOCl for 20 or 30 minutes. Therefore, the immersion times of 20 and 30 minutes were the most effective seed disinfection treatments without affecting germination and vigor. The higher concentrations of NaOCl may have increased the permeability of seed tissues, reducing their germination time (Figure 5D), since sodium hypochlorite is a strong oxidant and its action may change the properties of cell membranes of the integument or providing additional oxygen to the seed (ROCHA et al., 2007).

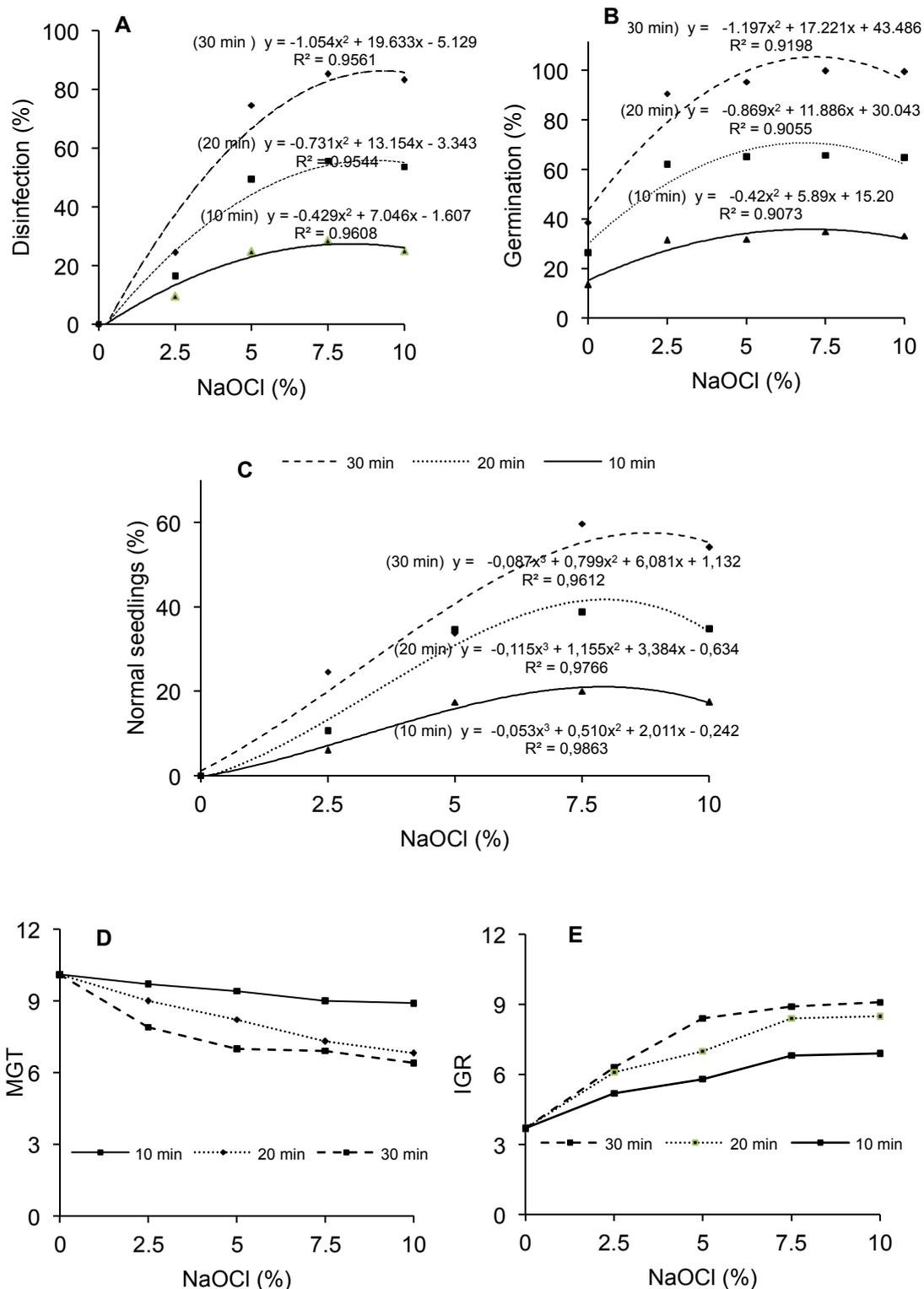


Figure 5 - Percentages of disinfected seeds (A), rates of germination (B), percentages of normal seedlings (C), mean germination time (MGT) (D), and the index of germination rate (IGR) (E) of canjerana seeds immersed in variant concentrations of NaOCl for different times. Santa Maria, RS, 2012/2013.

In this research, we used a higher concentration of NaOCl and longer time of immersion than Rocha et al. (2007) without significantly affecting seed germination and vigor. This is very important for disinfecting seed lots with higher contamination levels, since several species of pathogenic fungi can contaminate green and ripe fruits and seeds, reducing their germination, as observed in *Myrsine ferruginea* (Spreng) (REGO et al., 2009) and *C. fissilis* (VELL.) (BENETTI et al., 2009).

In the case of canjerana seeds, concentrations up to 10% of NaOCl for 30 minutes can be used, since it had a similar effect on seed germination and vigor as the 7.5% solution. This strategy is now being used for *in vitro* establishment of aseptic seedlings of canjerana.

The base culture medium affected seedling growth (Table 1). The WPM and MS medium resulted in taller seedlings, with more leaves and internodes and total length of roots than the ½ MS medium. Similar results were observed in *C. trichotoma* in which seedlings in WPM had better growth than those cultivated in ½ MS (FICK et al., 2007). The MS and WPM media resulted in superior *in vitro* growth of nodal segments of *Eugenia involucrata* (DC) (GOLLE et al., 2012).

Table 1 - Length of aerial parts, number of leaves and internodes, and total length of roots of canjerana seedlings cultivated in three culture media for 60 days. Santa Maria, RS, 2012.

Treatment	Length of aerial parts (cm)	Number of leaves	Number of internodes	Total length of roots (cm)
WPM	3.7 a ¹	5.1 a	2.5 a	10.3 a
MS	3.6 a	4.5 a	2.5 a	10.2 a
½ MS	2.4 b	2.5 b	2.1 b	6.6 b
Mean	3.2	4.0	2.4	9.0
CV (%)	4.5	6.3	5.9	9.7

¹ Means values followed by the same letter are not significantly different by Tukey's test at 5% of probability.

In canjerana, these results are probably due to a greater salt concentration of WPM and MS base medium in comparison to ½ MS base media, since WPM has a greater availability of vitamin thiamine-HCl than MS base media and both base media have different sources of nitrogen, as ammonium nitrate (NH₄NO₃) and potassium nitrate (KNO₃) that affect the ion balance of nitrate and ammonium ions (FICK et al., 2007). Therefore, the most appropriate culture medium will depend on

the species and type of explant. In this study, aseptic seedlings of canjerana had similar growth in both MS and WPM media.

In our experiments with cytokinins, there were no significant interactions ($p \geq 0.05$) between BAP concentrations and the source of explants for the number and length of shoots at 60 days (Table 2). The greatest growth was observed in the basal and intermediate segments, independent of the BAP concentration (Table 2). In this study, it is likely that apical segments in canjerana have less juvenility than basal and intermediate segments and their recalcitrance did not allow the production of shoots in apical segments, as in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (PEREIRA et al., 2011).

Table 2 - Shoot number and length of apical, intermediate and basal segments of canjerana cultivated in two concentrations of 6-benzylamine purine (BAP) for 60 days. Santa Maria, RS, 2012.

Treatments	Shoot number	Shoot length (cm)
Concentration		
BAP (0 μ M)	0.3a ¹	0.2a
BAP (2.5 μ M)	0.5a	0.5a
Type of segment		
Basal	0.9a	0.6a
Intermediate	0.4ab	0.4ab
Apical	0.0b	0.0b
Mean	0.4	0.3
CV (%)	27.2	11.8

¹Means values followed by the same letter are not significantly different by Tukey's test at 5% of probability.

The levels of the different cytokinins examined did not increase shoot number and length, and in fact TDZ significantly reduced the number of shoots (Table 3).

Table 3 - Shoot number and length of nodal segments of canjerana cultivated with different cytokinins for 60 days. Santa Maria, RS, 2013.

Cytokinins	Shoot number	Shoot length (cm)
BAP (2.5 μ M)	0.8 a ¹	0.5 a
KIN (2.5 μ M)	0.6 a	0.5 a
TDZ (2.5 μ M)	0.2 b	0.2 a
Control	0.6 a	0.4 a
Mean	0.5	0.4
CV (%)	5.9	8.6

¹Means values followed by the same letter are not significantly different by Tukey's test at 5% of probability.

This result suggests that, although TDZ is among the most active cytokinins, sometimes it may inhibit shoot formation, as in silver maple (PREECE et al., 1991). Moreover, increasing the concentration of BAP in the culture medium affected significantly shoot length, but did not affect shoot number (Figure 6). Regardless of treatment, the multiplication rates of canjerana were low. Similar low multiplication ratios were also found with *Myracrodruon urundeuva* (Fr. All) (ANDRADE et al., 2000) and *E. velutina* (Willd.) (COSTA et al., 2010) and is in agreement with previous studies of canjerana (ROCHA et al., 2007). According to these authors, the low number of shoots is due to these species having erect stems and a small treetop, which may affect the rate of *in vitro* multiplication and even the sprouting of vegetative material from the microclonal hedge. Another possibility would be that the physiology of canjerana nodal segments results in a monopodial development. According to Nicoloso and Erig (2002), in *Pfaffia glomerata* (Spreng Pedersen), the physiological condition of the apical segment induced the expression of monopodial development, which is an expression of the relationship between the indoleacetic acid (IAA) and cytokinins (TAIZ and ZEIGER, 1998). It might be possible to increase the number of shoots adding auxins and cytokinins to the culture medium. In *E. velutina* (Willd.), a better shoot formation were obtained, when their nodal segments were multiplied in WPM supplemented with 17.76 μM of BAP + 1.34 μM of NAA, as well as with cotyledonary nodes cultivated in WPM supplemented with 17.76 μM of BAP or 4.44 μM of BAP + 1.34 μM of NAA (COSTA et al., 2010). In this study, there was a significant difference in shoot length, beginning with BAP concentration of 3 μM .

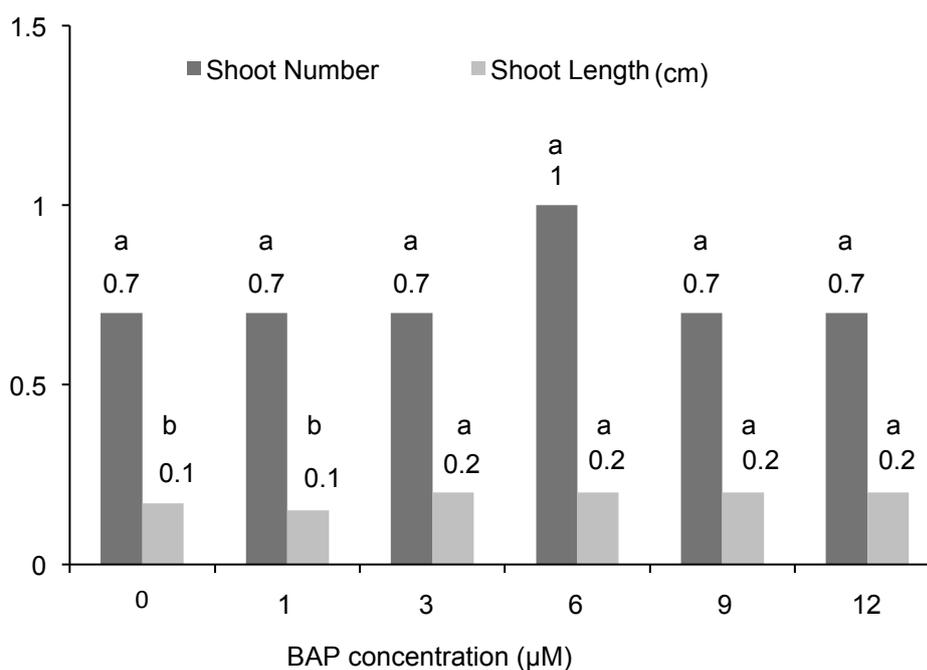


Figure 6 - Shoot number and length (cm) of nodal segments of canjerana cultivated in different concentrations of 6-benzylamine purine (BAP) for 60 days. Santa Maria, RS, 2013.

The culture media did not have a significant effect on the production of micro-cuttings per microstump, but the WPM medium resulted in a higher percentage of microstump survival (Table 4 and Figure 7). Probably, in canjerana the different composition and the less ionic concentration in WPM base media influenced significantly in a greater survival of microstumps (DESCHAMPS, 1993). In addition, WPM base media is used specifically for woody species and the requirement of a less amount of salts in their preparation, than MS base media, can reduce their cost.

Table 4 - Percentage of survival of microstumps and number of micro-cutting per microstump of canjerana cultivated in two culture media for 60 days. Santa Maria, RS, 2013.

Culture media	Survival (%)	Number of micro-cuttings
WPM	70.0 a ¹	1.40 a
MS	40.0 b	0.95 a
Mean	55.0	1.1
CV (%)	12.8	12.1

¹ Means followed by the same letter in a column are not significantly different by Tukey's test at 5 % of probability.

As observed with nodal segments, microstumps also showed a small number of shoots resulting in a low yield of micro-cuttings, with an average of 1.1 micro-cuttings per microstump, compared to *C. trichotoma* with more than two micro-cuttings per microstump (FICK et al., 2007).



Figure 7 – Microstump of *Cabralea canjerana* with two micro-cuttings and cultivated *in vitro*. Santa Maria, RS, 2013.

The base media and type of auxin had no effect on micro-cutting survival after 60 days of cultivation, but the addition of 5.0 μM of NAA increased the percentage of rooting and also the survival rate during acclimatization (Table 5).

Table 5 - Percentages of *in vitro* survival and rooting of canjerana micro-cuttings cultivated on two base medium, with or without two auxins after 60 days and the percentage of survival during acclimatization of rooted micro-cuttings after 30 days of acclimatization in a humid chamber in the greenhouse. Santa Maria, RS, 2012/2013.

Treatments	<i>In vitro</i> survival (%)	Rooting (%)	Survival during acclimatization (%)
Base medium			
WPM	75.0 a ¹	20.0 a	-
MS	65.0 a	31.6 a	-
Auxins			
NAA (5.0 μM) ²	70.0 a	57.5 a	62.5 a
IBA (5.0 μM) ³	67.5 a	20.0 b	37.5 b
Control (0 μM)	72.5 a	0.0 c	0.0 c
Mean	70.0	25.8	33.3
CV (%)	19.5	27.2	22.4

¹ Means followed by the same letter are not significantly different by Tukey's test at 5 % of probability.

² NAA= naftalen acetic acid.

³ IBA= indolebutyric acid.



Figure 8 – Rooted micro-cutting of canjerana, *Cabralea canjerana*, cultivated *in vitro*. Santa Maria, RS, 2012.

In this study, the addition of NAA to the base medium resulted in a higher percentage of rooting (57.5%) than the addition of IBA (20%) (Table 5). This percentage of rooting is not as high as the one found with micro-cuttings of canjerana cultivated in $\frac{1}{2}$ MS medium added of 5.0 μM of IBA, which was 87.5% (ROCHA et al., 2007).

In other studies, rooting percentages of more than 70% were found with cordia micro-cuttings treated with an even lower concentration of 2.5 μM of IBA (MANTOVANI et al., 2001). In the holly plant, *I. paraguariensis*, increasing the level of IBA up to 7,8 μM in the $\frac{1}{4}$ MS medium resulted in a significantly higher percentage of rooting (HORBACH et al., 2011). In this work, the addition of 5.0 μM NAA to the base medium also increased the percentage of survival during acclimatization from 37.5% to 62.5% (Table 5 and Figure 9), although these values were not high. It is likely that rates of survival during acclimatization can be achieved by selecting appropriate combination of substrate material and keeping high air humidity.

This suggests that tissue culture will be most valuable in maintaining superior genotypes of canjerana *in vitro* or as a source of stock plants for the microclonal hedge. Therefore, the micropropagation and micro-cutting of canjerana, as other native tree species, has a high potential for maintaining germoplasm *in vitro*, accelerating the breeding program for superior genotype identification, and obtaining

high vigorous stock plants for the mass production of plantlets in the microclonal hedge.



Figure 9 – Acclimatized microcutting of canjerana, *Cabralea canjerana*, cultivated in plastic pot with commercial substrate (organic pine bark base). Santa Maria, RS, 2012.

3.4 Conclusion

The concentration of 7,5% of NaOCl for 30 minutes resulted in a greater percentage of disinfection and germination rate combined with higher vigor. Seedlings can be cultivated in MS or WPM base media. Nodal segments will not root in MS or WPM base media. Micro-cuttings produced from microstumps of these seedlings can be rooted in MS or WPM base media with the addition of 5,0 μM of NAA after two months of cultivation in WPM base media. Both nodal segments and micro-cuttings have a low rate of multiplication. Therefore, micropropagation will be more appropriate in maintaining superior genotypes or as a source of stock plants for a microclonal hedge.

3.5 References

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

BENETTI, C. S.; SANTOS, A. V. D.; MEDEIROS, A. C. S. D.; FILHO, D. S. J. D. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenezidade e *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 79-83, 2009.

COSTA, G. S. D.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. D. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.

DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa *in vitro* de sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell. Arg.), espécie florestal de mata ciliar**. 1993. 128 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura de Lavras. Lavras. 1993.

DURKOVIC, J.; LUX, A. Micropropagation with a novel pattern of adventitious rooting in American sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.). **Trees**, v. 24, n. 3, p. 491-497, 2010.

FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C., WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 102-109, 2010.

FICK, T. A.; BISOGNIN, D. A.; QUADROS, K. M.; HORBACH, M.; REINIGER, L. R. S. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de Louro Pardo (*Cordia trichotoma*) *in vitro*. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

GRUNENVALDT, R. L.; CANTARELLI, E. B.; SALAMONI, A. T. Armazenamento e viabilidade de sementes de *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 1, p. 98-105, 2014.

HAGGMAN, H.; SUTELA, S.; WALTER, C., FLADUNG, M. **Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century**. In Biosafety Considerations in the Context of Deployment of GE Trees. Edited by T. Fenning. p. 491-525, 2014.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall. 2011. 928 p.

HENDRIX, S. D.; KYHL, J. F. Population size and reproduction in *Phlox pilosa*. **Conservation Biology**, v. 14, n.1, p. 304-313, 2000.

HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P.; QUADROS, K. M. D.; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de erva mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 113-119, 2011.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327, 1981.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de Louro Pardo (*Cordia trichotoma* (VELL.) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MARTINS, J. P. R.; SANTOS, B. R.; BARBOSA, S.; MÁXIMO, W. P. F.; BEIJO, L. A.; PAIVA, R. Crescimento e Aspectos Sintomatológicos na Aclimatização de Ipê Roxo. **Cerne**, v. 17, n. 4, p. 435-442, 2011.

MERRIT, D. J.; DIXON, K. W. **Seed storage characteristics and dormancy of Australian indigenous plant species**. In Seed conservation: turning science into practice. Edited by Smith, R.D., Dickie, J.B., Lington, S.H., Pritchard, H.W. and Probert, R.J. Royal Botanical Gardens Kew, Crownwell, London. p. 809-823, 2003.

MERRIT D. J.; TURNER S. R.; CLARKE S.; DIXON, K. W. Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 3, p. 336-344, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pendersen *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 00, p. 1499-1506, 2002.

OZUDOGRU, E. A.; KIRDOK, E.; KAYA, E.; CAPUANA, M.; CARLO, A. D.; ENGELMANN, F. Medium-Term conservation of Redwood (*Sequoia sempervirens* (D Don) Endl.) *in vitro* shoots cultures and encapsulated buds. **Scientia Horticulturae**, v. 127, n. 3, p. 431-435, 2011.

PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; TEIXEIRA, D. S.; MISSIO, F. F. M.; TONETT, E. L. Estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de Araucária (*Araucaria angustifolia*). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 4, p. 303-309, 2014.

PREECE J. E.; HUETTEMAN C. A.; ASHBY W. C.; ROTH P. L. Micro and cutting propagation of silver maple. 1. Results with adult and juvenile propagules. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 116, p. 142-148, 1991.

REGO, S. S.; SANTOS, A. F. D.; MEDEIROS, A. C. S. D. Fungos associados aos frutos e sementes de capororoca *Myrsine ferruginea*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 87-90, 2009.

ROCHA, S. C.; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

SIVARAJAN, A.; ANBAZHAGAN, M.; ARUMUGAM, K. Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using different techniques. **International Journal of Research in Plant Science**, v. 4, n. 2, p. 42-45, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 2008. 819 p.

VARSHNEY, A.; ANIS, M. **Trees: propagation and conservation (Biotechnological approaches for propagation of a multipurpose Tree, *Balanites aegyptiaca* Del.)**. New Delhi: Springer. 2014. 116 p.

VIEITEZ, A. M.; CORREDOIRA, E.; MARTÍNEZ, M. T.; SAN-JOSÉ, M. C.; SÁNCHEZ, C.; VALLADARES, S.; VIDAL, N.; BALLESTER, A. Application of Biotechnological tools to *Quercus* improvement. **European Journal of Forest Research**, v. 131, p. 519-539, 2012.

4 CHAPTER II

¹PROPAGATION OF *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart. BY MINI-CUTTING

Abstract

Canjerana, *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart. is a tree species indigenous to Brazil that when grown and managed in plantation systems is of great ecological and economic importance. Due to the difficulty of producing seminal seedlings, we examine the possibility of vegetative propagation by evaluating the rooting potential of canjerana mini-cuttings with different concentrations of indolbutyric acid (IBA) and substrate combinations. Mini-cuttings were treated with 2000 mg L⁻¹ of IBA and planted in commercial substrate; coarse sand; carbonized rice husks; and a combination of the three. Apical and nodal mini-cuttings were treated with 0, 1000, 2000 and 3000 mg L⁻¹ of IBA and planted in a combination of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks. A miniclone hedge was formed with three clones of canjerana to evaluate ministump productivity and mini-cutting rooting. The combination of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks maximized mini-cuttings rooting. Nodal mini-cuttings had higher rooting capability than apical ones. The application of 3000 mg L⁻¹ of IBA improved rooting differentiation and growth of canjerana mini-cuttings. Canjerana clones differ in rooting capability and survival rates in vegetative propagation systems, but the use of a mini-cutting propagation system is a feasible production technique for this important species.

¹ Accepted for publication in the Journal of Horticulture and Forestry on 10/24/2014.

4.1 Introduction

Cabralea canjerana (VELL.) Mart., known as canjerana in southern Brazil, is a native tree species that belongs to the Meliaceae family. Canjerana is a common species in some Atlantic Forest fragments, and it is very important for forest regeneration programs in degraded areas (NOBREGA et al., 2008). The wood is considered to be one of the most valuable, with excellent quality characteristics and high resistance to the attack of xylophage insects. The stem bark can be used for the extraction of a commercially important red dye. Both the stem bark and the roots have medicinal properties and can be used as a purgative, febrifuge, abortifacient, antidyspeptic, astringent and emetic (CARVALHO, 2006). Extracts from leaves and seeds can affect the development of *Ascia monuste orseis* larvae, reducing leaf consumption in cabbage (MATA and LOMONACO, 2013).

The seeds of canjerana present recalcitrant storage behavior, with a drastic reduction in germination after 15 days of beneficitation (GRUNENVALDT et al., 2014), which is an obstacle for the production of seminal seedlings. Vegetative propagation enables the production of plantlets in any season and the establishment of specific and favorable combinations of important characters, as well as the possibility of fixing superior genetic interactions and high levels of heterozygosity (ZOBEL, 1992; GASPAR et al., 2005). As canjerana provides wood and other products, the development of efficient clonal propagation techniques for superior genotypes will increase management and productivity of commercial plantations, thereby contributing to local economies.

The use of mini-cuttings is one of the most recent techniques for vegetative propagation. The mini-cutting technique can enhance propagation efficiency and was developed to overcome the rooting problems of some adult plants of the genus *Eucalyptus* sp. (WENDLING et al., 2005). Mini-cuttings from rejuvenated propagules are used for regeneration and mass production of woody species plantlets (HARTMANN et al., 2011). In some clones of *Eucalyptus* sp. the mini-cuttings from rejuvenated plant material develop a better root system than is found in mini-cuttings from non-rejuvenated tissue (WENDLING and XAVIER, 2005). Research results with other tree species indicate the viability of using rooted mini-cuttings for commercial

propagation (DUMROESE et al., 2003; XAVIER et al., 2003; WENDLING et al., 2007; LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2010; DIAS et al., 2012).

In the plantlet production from mini-cuttings, the substrate plays a fundamental role in root initiation and growth. It keeps the mini-cuttings in an upright position, provides a matrix for needed water and nutrients, and improves root differentiation and growth. Because of these specific but multifaceted requirements, the best substrate is usually composed of a variety of different materials that fulfill these physical functions and facilitate the hormonal stimulation of the desired growth responses, as well as providing availability of needed assimilates for rooting and plant health (FONTENO et al., 1981; SMART et al., 2003). Frequently in forest species, the inclusion of exogenous indolbutyric acid (IBA) has been shown to improve root differentiation (WISE et al., 1985; ROSIER et al., 2004; SAN JOSE et al., 2012). However, mini-cuttings of some woody species have been shown to root even without the application of IBA (SILVA et al., 2010; FERREIRA et al., 2010).

The choice of the substrate for the production of plantlets should take into consideration physical factors, such as texture and density, which interfere with aeration, water retention capacity and aggregation of the substrate (WENDLING and GATTO, 2002). A good substrate must provide sufficient porosity to allow good aeration and have a high water retention capacity (HARTMANN et al., 2011). Recommendations in the literature vary from an addition of 20 to 40% or a reduction of 60 to 80% of porous material (carbonized rice husks, coconut fiber, pine needles, compost, etc.) for the substrate composition for different species and propagation conditions (WENDLING and GATTO, 2002). Substrates with air-filled pore space of 30%, with total porosity of 85% and water availability between 24 and 40% were considered as ideal conditions for seedling production (SCHIMITZ et al., 2002), but no such information was found for mini-cuttings rooting. The three individual substrates, carbonized rice husks, commercial substrate, and coarse sand, and their combinations exhibit different physical properties from those considered ideal by Schimitz et al. (2002) for seedlings production. Carbonized rice husks increase the total porosity and air-filled pore space in the combination of substrates, but not to the optimum level suggested by Schimitz et al. (2002). This probably explains why the best substrate is usually obtained by using a mixture of components to ensure nutritional balance and diverse microbial flora (WENDLING and GATTO, 2002).

Given the ecological and economic importance of canjerana and the difficulty of producing seminal seedlings, this study was intended to examine the possibility of vegetative propagation by mini-cuttings. The objective was to evaluate the rooting potential of canjerana mini-cuttings with different concentrations of IBA and substrate combinations.

4.2 Material and methods

The study was carried out in an acclimatized greenhouse of polycarbonate 10 mm panels with maximum temperature set to 32°C. For the experiments, one-year-old seedlings of canjerana were placed in plastic pots containing 300 cm³ of a commercial substrate (organic pine bark base) and submitted to drastic pruning (coppice) to produce the sprouts that were used for mini-cutting preparation after 60 days. The coppice seedlings were manually irrigated twice a week with a nutrient fertilizer solution with 50% of the salt concentrations as described by Wendling et al. (2007). The mini-cuttings were grown in a vertical position in polyethylene trays (55 x 34 x 15 cm) containing the substrate and maintained in a greenhouse with a system of intermittent misting, mean air temperature of 25°C, and relative humidity of approximately 80%. The high relative humidity was maintained by nebulizers, triggered by a timer. After evaluating rooting and survival in a mist chamber, the rooted mini-cuttings were acclimatized in a greenhouse for 30 days and used for the formation of the miniclonal hedge.

The first experiment evaluated the effect of the substrate on mini-cutting rooting and survival. The bases of single bud mini-cuttings, 1.5 to 2.0 cm long containing a half leaflet (Figure 10), were immersed for 10 seconds in a 50% water/ethanol solution containing 2000 mg L⁻¹ of IBA and placed in one of the four substrates: commercial (organic pine bark base); coarse sand; carbonized rice husks; and the combination of equal proportions by volume of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks. Samples of these substrates were collected, dried at 65°C for 48 hours and submitted for physical analysis (FERMINO, 2003).



Figure 10 – Mini-cutting of canjerana *Cabralea canjerana*. Santa Maria, RS, 2012.

After 60 days of cultivation, mini-cuttings were evaluated for rooting and survival and the number and total length of roots (cm). The experiment was a complete random design with five replicates of four mini-cuttings.

The second experiment evaluated the type of mini-cuttings (apical and nodal) of 1.5 to 2.0 cm in length containing a half leaflet. The bases of mini-cuttings were immersed for 10 seconds in a 50% water/ethanol solution containing either 0, 1000, 2000 or 3000 mg L⁻¹ of IBA. The control treatment consisted of a 50% water/ethanol solution. A mixture of equal proportions by volume of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks was used as substrate. The rooting and survival of the shoots and the number and total length of roots (cm) per mini-cutting were evaluated after 60 days of cultivation. The experiment was a 2 x 4 factorial (apical and nodal mini-cuttings by IBA concentrations) in a complete random design with five replicates of four mini-cuttings.

The third experiment evaluated the productivity of individual ministumps and rooting of mini-cuttings of three clones of canjerana. The miniclonal hedge was established in a soilless system subirrigated with nutrient solution (BANDINELLI et al., 2013). Twelve rooted mini-cuttings (complete plantlets) per single stock plant of canjerana were planted at a 10 x 10 cm spacing in one tray to form the miniclonal hedge (Figure 11A) and given a 15 minutes daily irrigation with a nutrient solution at 50% concentration of salts as described by Wendling et al. (2007).

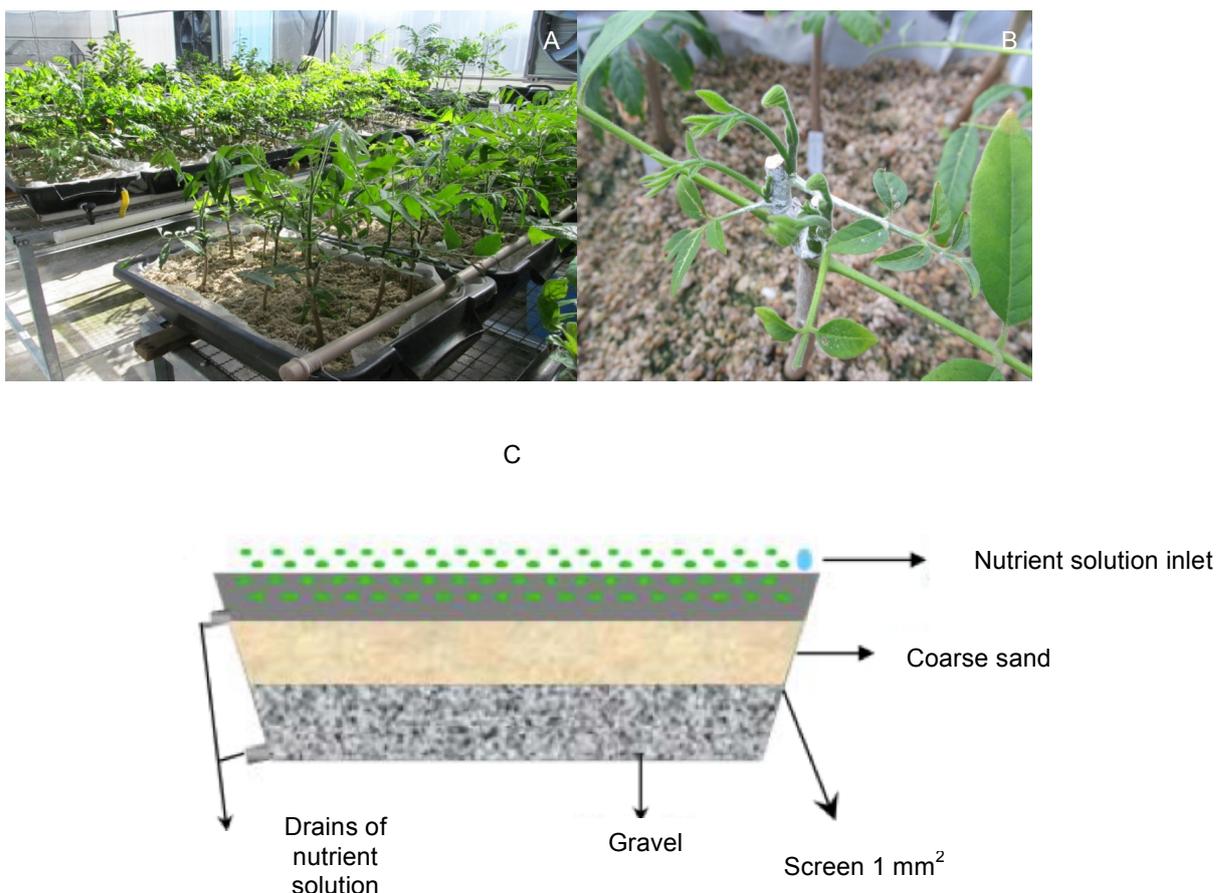


Figure 11 – Miniclonal hedge of canjerana, *Cabralea canjerana* (A), sprouts of a ministump (B), Santa Maria, RS, 2012/2013; and sketch of the miniclonal hedge in soilless system subirrigated with nutrient solution (BANDINELLI et al., 2011).

The pH of the nutrient solution was maintained between 5.5 and 6.0 and an electrical conductivity in 1.5 dS m^{-1} . The sprouts of three consecutive harvesting times of the three clones were used to prepare mini-cuttings of 1.5 to 2.0 cm in length containing a half leaflet.

The mini-cuttings were treated with 3000 mg L^{-1} of IBA solution for 10 seconds and planted in a combination of equal proportions by volume of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks. The number of mini-cuttings per ministump was recorded and the percentage of survival and rooting were evaluated at 60 days after planting. The experiment was a complete random design with eight replicates of six mini-cuttings.

Data were submitted to analysis of variance and for those variables with significant differences ($p \leq 0.05$), treatment means were compared by Tukey test or polynomial regression, as appropriate. For purposes of analysis, percentage data

were transformed to $\arcsin\sqrt{x/100}$ and counting data to $\sqrt{x+0.5}$ to attend the statistical presuppositions. All analysis were done with the ESTAT (UNESP - Jaboticabal) program.

4.3 Results and discussion

These are the first results of canjerana vegetative propagation by mini-cuttings. Carbonized rice husks and the mixture of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks were the substrates with air-filled pore space that came closer to the optimal value of 30% (Table 6).

Table 6 - Physical properties of the substrates used for the evaluation of the rooting capacity of canjerana. São Vicente do Sul, RS, 2013.

Substrates ¹	Dry density (kg m ⁻³)	Total porosity (%)	Aeration space in saturated substrate (%)	Water availability (%)
Comercial	335	50	15.4	5.4
Coarse Sand	1505	27	12.6	11.5
CRH	167	41	31.4	2.8
Comercial+CS+CRH	56	43	23.9	4.4

¹ Commercial: organic pine bark base; CS: coarse sand; CRH: carbonized rice husks.

The different substrates affected the rooting and survival percentages of canjerana mini-cuttings ($p \leq 0.05$). The combination of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks resulted in the highest percentage of mini-cutting rooting (Table 7).

Table 7 - Percentage survival and rooting and number and length of roots of mini-cuttings of canjerana treated with 2000 mg L⁻¹ of indolbutyric acid and grown in different substrates after 60 days of cultivation. Santa Maria, RS, 2012.

Substrates ¹	Survival (%)	Rooting (%)	Number of roots	Length of roots (cm)
Comercial	70.0 b ²	15.0 b	1.8 a	3.3 a
Coarse sand	70.0 b	45.0 b	1.8 a	2.5 a
CRH	85.0 b	30.0 b	1.8 a	2.7 a
Comercial+CS+CRH	100.0 a	75.0 a	1.7 a	3.0 a
Mean	81.2	41.2	1.8	2.9
CV (%)	14.1	39.4	14.4	8.6

¹ Comercial: organic pine bark base; CS: coarse sand; CRH: carbonized rice husks.

² Means values followed by the same letter in a column are not significantly different by the Tukey's test at the probability of 5 %.

The number and length of roots per mini-cutting did not differ significantly across substrates. On average, rooted mini-cuttings produced 1.8 roots with an average total length of 2.9 cm. In the experiment using individual substrates (soil, sand, carbonized rice husks, peat, decomposed residue of black wattle bark) and their combinations, only the sand showed a value of available water within the ideal range for its use as a substrate for seedlings production, which implies that this material can ensure high water availability (SCHIMITZ et al., 2002). The increased survival in combined substrate (Table 7) may reflect the effect of the coarse sand resulting in increased water availability to the mini-cuttings of canjerana. For *M. ilicifolia* (Mart. ex Reissek) a higher rooting percentage (94.3%) was obtained with mini-cutting cultivation in pure commercial substrate (LIMA et al., 2009). Rooting of *C. brasiliense* (Camb.) mini-cuttings was lower in commercial substrates (bark composted pine) and carbonized rice husks when compared with vermiculite (SILVA et al., 2010). Clearly then, the optimal substrate varies according to species and conditions of rooting, and substrate evaluation is essential in optimizing rooting protocols given their determinant role in defining the range of root induction.

Mini-cuttings from nodal segments showed a higher percentage of rooting and an increased number and length of roots in comparison to the apical ones (Table 8).

Table 8 - Percentage of survival and rooting and number and length of roots of apical and nodal canjerana mini-cuttings after 60 days of cultivation. Santa Maria, RS, 2012/2013.

Mini-cuttings	Survival (%)	Rooting (%)	Number of roots	Total length of roots (cm)
Nodal	80.0 a ¹	50.0 a	2.2 a	6.3 a
Apical	74.0 a	17.0 b	1.4 b	3.0 b
Mean	77.0	34.0	1.8	4.6
F value ²	0.2 ^{ns}	5.3**	4.5**	36.6**
CV (%)	22.7	57.1	21.0	13.6

¹ Means values followed by different letters in a column are significantly different by the F test at the indicated probability.

² (^{ns}) no significant, (*) significant at 5% of probability, and (**) significant at 1% of probability.

The increment in rooting percentage of nodal segments was 2.9 folds. No significant difference in survival was observed between apical and nodal mini-cuttings. Interestingly, there were no significant differences ($p \geq 0.05$) in the responses of nodal versus apical explants to the IBA treatments, so data from the apical and nodal mini-cuttings were combined in table 9.

Table 9 - Percentage survival and rooting and number and length of roots of mini-cuttings of canjerana treated or untreated with indolbutyric acid (IBA) after 60 days of cultivation. Santa Maria, RS, 2012/2013.

Mini-cuttings	Survival (%)	Rooting (%)	Number of roots	Total length of roots (cm)
Treated with IBA	79.3 a ¹	43.3 a	2.0 a	5.2 a
Untreated	70.0 a	5.0 b	1.1 b	2.6 b
Mean	74.6	24.1	1.5	3.9
F value ²	1.3 ^{ns}	12.9**	14.8**	70.0**
CV (%)	17.8	52.1	13.6	10.5

¹ Means values followed by different letters in a column are significantly different by the F test at the indicated probability.

² (^{ns}) no significant, (*) significant at 5% of probability, and (**) significant at 1% of probability.

Given the lack of IBA treatment effects in this experiment, the differences found between nodal and apical mini-cuttings may be associated with the levels of carbohydrates, amino acids and other substances that promote adventitious rooting of certain tissues of the mini-cuttings, as noted by Hartmann et al. (2011). Thus, the mini-cuttings from nodal segments may have more appropriate levels of reserves than the apical ones, which would improve rooting capability. In addition, cells that have hormones or other compounds that confer an endogenous potential for root formation, such as auxin, quickly react to specific stimuli, like light and temperature

(SORIN et al., 2005). It is possible that mini-cuttings from nodal segments have a better competence for rooting, but it does not affect mini-cutting survival.

The ministumps of canjerana had adequate nutritional level and the mini-cuttings for comparisons between clones were taken from the same sprouting period, with differences thus being an indication of existing genetic variation between canjerana clones, as expected. These results clearly indicate the effect of nodal and apical mini-cuttings on root initiation and growth. These differences are very important in developing a system for mass production of plantlets, because of economic and labor usage issues. It is possible that these differences are minimized with the advancing age of the shoots and the size of the mini-cuttings (greater than 2.0 cm for example), which should be the aim of future studies.

In other species, such as *C. brasiliense* (Camb.), apical and nodal mini-cuttings did not differ for rooting (SILVA et al., 2010). These results were attributed to the good nutritional status of stock plants of the miniclinal hedge, as well as to the physiological age of the two types of mini-cuttings, which makes them similar in the degree of juvenility and tissue lignification. In a study with mini-cuttings of *A. macrocarpa* (Benth) Brenan, apical mini-cuttings were more responsive to rooting than nodal ones (DIAS et al., 2012), being attributed to the greater degree of juvenility and less lignification of apical tissues (XAVIER et al., 2003). Furthermore, apical mini-cuttings have a higher concentration of endogenous rooting promoters by virtue of their proximity to both the sites of auxin synthesis and to less differentiated tissues, potentially resulting in increased dedifferentiation of cells to their meristematic condition, which is essential for root initiation (GEHLOT et al., 2014).

The application of IBA increased ($p \leq 0.05$) the percentage of rooting and the length and number of roots per canjerana mini-cutting (Table 9). The application of IBA did not significantly affect the survival of the mini-cuttings. Increasing the concentration of the IBA treatment improved the percentage of rooting and increased both the number and length of roots (Figure 12A and 12B).

At 60 days, canjerana mini-cuttings treated with IBA showed a higher percentage of survival and rooting, as well as increased root growth compared with mini-cuttings with no IBA treatment (Table 9). Auxin application enhances root formation in species with low rooting response, as governed by either genotype or physiological stage (XAVIER et al., 2003). It is possible that low rooting response is caused by low content of endogenous auxin, which often requires the exogenous

application of growth regulators to establish the competence and determination of target cells (TAIZ and ZEIGER, 2008). Therefore, canjerana fits in this group of species, because the application of IBA increased both rooting percentage and the number and length of the new roots (Table 9 and Figure 12), which explains the higher rooting of canjerana mini-cuttings treated with IBA.

The observed differences in average root length may be associated with the increase in rooting competence promoted by IBA application that resulted in a rapid differentiation of the tissues for the formation of adventitious roots in canjerana mini-cuttings. In this study, only the nodal mini-cuttings treated with 2000 or 3000 mg L⁻¹ of IBA had already developed adventitious roots at 30 days after cultivation (data not shown).

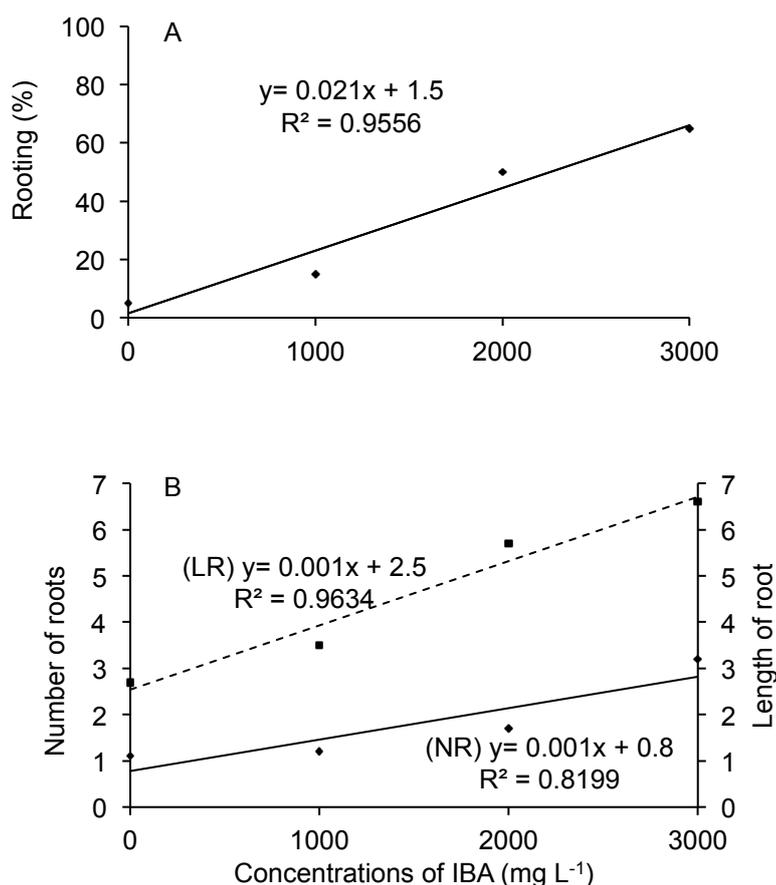


Figure 12 - Rooting percent (A) and number (NR) and length of roots (LR) (cm) (B) of mini-cuttings of canjerana treated with different concentrations of indolbutyric acid (IBA) after 60 days of cultivation. Santa Maria, RS, 2012/2013.

The use of IBA resulted in an increased percentage of rooting and both the number and length of roots in the canjerana mini-cuttings (Figure 12). Also, the use of IBA favored rooting and did not affect the survival of mini-cuttings (Table 9), indicating that there was no phytotoxic effect in any of the tested concentrations (Figure 12). Mini-cuttings responded to an increase in IBA concentration up to 3000 mg L⁻¹, which can be considered a high concentration for mini-cuttings. At that concentration, 65% of mini-cuttings rooted, with an average of 3.2 roots per mini-cutting which averaged 6.6 cm in length at 60 days following cultivation. This contrasts with some previous mini-cutting studies in which the use of IBA concentrations above 2000 mg L⁻¹ had negative effects on rooting due to the high degree of juvenility of the new shoot (TITON et al., 2003). It is thought that this is due to the fact that the juvenile mini-cuttings already have tissues with an endogenous hormonal balance that is favorable for rooting, which then leads to no (SILVA et al., 2010; FERREIRA et al., 2010; WENDLING et al., 2010) or even a negative response to exogenous application of IBA (XAVIER et al., 2003).



Figure 13 – Rooted mini-cuttings of canjerana, *Cabralea canjerana*, in different IBA concentrations. Santa Maria, RS, 2012/2013.

The production of mini-cuttings per ministump did not differ among the clones of canjerana that were evaluated in this study. The lowest production of mini-cuttings per ministump was 1.8 in the first harvest period and the highest was 3.0 in the third harvest (Table 10).

Table 10 - The average number of mini-cuttings (NM) and percentages of survival (S) and rooting (R) of mini-cuttings of canjerana harvested at three different harvested dates from ministumps formed from mini-cuttings that were rooted in a soilless system subirrigated with nutrient solution. Santa Maria, RS, 2012/2013.

Clones	Harvest I			Harvest II			Harvest III		
	NM	S (%)	R (%)	NM	S (%)	R (%)	NM	S (%)	R (%)
SM1	2.5 a ¹	84 c	53 b	2.7 a	73 c	69 a	2.8 a	72 a	72 b
SM3	2.4 a	98 a	50 b	2.5 a	79 b	51 b	2.6 a	55 b	52 b
SM13	1.8 a	93 b	67 a	2.9 a	90 a	68 a	3.0 a	81 a	80 a
Mean	2.2	92	57	2.7	81	63	2.8	69	68
CV (%)	12.04	3.69	3.84	11.05	3.47	4.37	10.52	3.23	4.99

¹ Means values followed by the same letter in a column are not significantly different by the Tukey's test at the probability of 5 %.

The survival of ministumps was 95% and did not differ among harvest dates or clones (data not shown). In mini-cuttings from the miniclinal hedge grown in a soilless system using subirrigation with a nutrient solution, the average production of mini-cuttings per harvesting date was 2.2 for the first harvest period, 2.7 for the second harvest period, and 2.8 for the third harvest period. These values were higher than has been reported for *C. fissilis* (VELL.) (XAVIER et al., 2003) and lower than those observed in *I. paraguariensis* (WENDLING et al., 2007). There were significant differences in rooting ($p \leq 0.05$) among clones and harvest dates. The rooting percentage was 50% or greater in all treatments and showed an increase during the successive harvest periods. Interestingly, survival percentage dropped as rooting percentage increased (Table 10). In a study with *L. styraciflua* (L.), the survival percentage of rooted mini-cuttings were influenced by relative humidity and sunlight during the acclimatization period in the greenhouse and outdoor conditions (WENDLING et al., 2010). Therefore, increasing the harvesting period of canjerana mini-cuttings can enhance the productivity of ministumps, and the maintenance of mini-cuttings in the greenhouse conditions may increase survival and rooting, as mentioned by Wendling et al. (2010). The decline in survival was particularly evident in the clone SM3. This interplay between survival, rooting percentage, and clone indicates the need for tailoring production systems specifically for each clone that will be propagated.

The results of this study clearly show that vegetative propagation by mini-cuttings is a feasible alternative for the mass production of canjerana plantlets for

commercial plantation establishment (Figure 14B). Apical and nodal mini-cuttings with 1.5 to 2.0 cm in length containing a half leaflet may be planted in media consisting of the same proportions of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks. Clearly, though, nodal mini-cuttings have a higher competence for rooting. Based on this work, mini-cuttings should be treated with 3000 mg L⁻¹ of IBA for the greatest rooting efficiency. Given clonal differences in these studies, it is possible that mini-cuttings with different amounts of reserves and/or from other clones might have a greater competence for rooting or higher survival rates during the propagation process, which would facilitate the mass production of plantlets, possibly with lower concentrations or even without the application of IBA. Once the rooted mini-cuttings are acclimatized in the greenhouse they may be transferred to either the miniclinal hedge (Figure 11A) or to a full sun area for further acclimatization.



Figure 14 – Rooted mini-cutting from a miniclinal hedge (A) and an acclimatized plantlet (B) of canjerana, *Cabralea canjerana*. Santa Maria, RS, 2012.

The new plantlets (Figure 14B) can then be effectively planted in the field for growth and wood quality evaluations. Therefore, this work shows that the use of mini-cuttings is a feasible technique for mass production of canjerana plantlets for plantation establishment from selected clones in order to enhance management and growth of this important species.

4.4 Conclusion

Combination of commercial substrate, coarse sand and carbonized rice husks maximizes rooting of canjerana mini-cuttings. Mini-cuttings from nodal segments showed greater competence in rooting than apical segments. Application of 3000 mg L⁻¹ of IBA promotes differentiation and development of roots in canjerana mini-cuttings. After acclimatization in the greenhouse, rooted mini-cuttings can be transferred to the miniclinal hedge or acclimatized in a full sun area for plantlet establishment in the field for further assessment of their development and wood quality.

4.5 References

BANDINELLI, M. G.; BISOGNIN, D. A.; GNOCATO, F.; S.; MAMBRIN, R.; B.; SAUSEN, D.; NICOLOSO, F.; T. MS salt and sucrose concentrations in the *in vitro* multiplication and acclimatization of potato. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 242-247, 2013.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Embrapa informação tecnológica; Colombo: Embrapa Floresta. v. 2, 2006. 628 p.

DIAS, P. C.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; PAIVA, H. N.; CORREIA, C. G. Vegetative propagation of angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) through cuttings and mini-cuttings techniques. **Revista Árvore**, v. 36, n. 3, p. 389-399, 2012.

DUMROESE, R. K.; WENNY, D. L.; MORRISON, S. J. Propagation protocol for container willows and poplars using mini-cuttings. **Native Plants Journal**, v. 4, n. 2, p. 137-139, 2003.

FERMINO, M. H. **Métodos de análise para caracterização física de substratos para plantas**. 2003. 89 f. (Tese de Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; NOGUEIRA, A. C. Mini-cutting of *Sapium glandulatum* (VELL.) Pax with the use of indolebutyric acid and naphthalene acetic acid. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 1, p. 19-31, 2010.

FONTENO, W. C.; CASSEI, D. K.; LARSON, R. A. Physical properties of three container media and their effect of *Poinsettia* growth. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 106, n. 6, p. 731-746, 1981.

GASPAR, M. J.; BORRALHO, N.; GOMES, A. L. Comparison between field performance of cuttings and seedlings of *Eucalyptus globulus*. **Annual Forestry Science**, v. 62, p. 837-841, 2005.

GEHLOT, A.; GUPTA, R. K.; TRIPATHI, A.; ARYA, I. D.; ARYA, S. Vegetative propagation of *Azadirachta indica*: effect of auxin and rooting media on adventitious root induction in mini-cuttings. **Advances in Forestry Science**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2014.

GRUNENVALDT, R. L.; CANTARELLI, E. B.; SALAMONI, A. T. Armazenamento e viabilidade de sementes de *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 1, p. 98-105, 2014.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall. 2011. 928 p.

LIMA, D. M. D.; TANNO, G. N.; PURCINO, M.; BIASI, L. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.; ZANETTE, F. Rooting of espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) mini-cuttings on different substrates. **Ciência Agrotécnica**, v. 33, n. 2, p. 617-623, 2009.

MATA, R. F. F.; LOMONACO, C. Toxicity, deterrence and repelence of aqueous extracts of *Cabralea canjerana* ssp. *polytricha* (Meliaceae) on *Ascia monuste orseis* (Lepidoptera), the cabbage caterpillar. **Revista Árvore**, v. 37, n. 2, p. 361-368, 2013.

NOBREGA, A. M. F.; VALERI, S. V.; PAULA, R. C.; SILVA, S. A. Natural regeneration in forest remainders and reforested areas of Mogi-Guaçu river floodplain in Luiz Antônio county, São Paulo, Brazil. **Revista Árvore**, v. 32, n. 5, p. 909-920, 2008.

ROSIER, C. L.; FRAMPTON, J.; GOLDFARB, B.; BLAZICH, F. A.; WISE, F. C. Growth stage, auxin type, and concentration influence rooting of stem cuttings of fraser fir. **Hortscience**, v. 39, n. 6, p. 1397-1402, 2004.

SAN JOSÉ, M. C.; ROMERO, L.; JANEIRO, L. V. Effect of indole-3-butyric acid on root formation in *Alnus glutinosa* micro-cuttings. **Silva Fennica**, v. 46, n. 5, p. 643-654, 2012.

SCHIMITZ, J. A. K.; SOUZA, P. V. D. D.; KAMPF, A. N. Physical and chemical properties of substrates with mineral and organic origin for growth of potted plants. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 937-944, 2002.

SILVA, R. L.; OLIVEIRA, M. L. D.; MONTE, M. A.; XAVIER, A. Guanandi (*Calophyllum brasiliense*) clonal propagation through mini-cuttings. **Agronomia Costarricense**, v. 34, n. 1, p. 99-104, 2010.

SMART, D. R.; KOCSIS, L.; WALKER, M. A.; STOCKERT, C. Dormant buds and adventitious root formation by *Vitis* and other woody plants. **Journal of Plant Growth Regulators**, v. 21, p. 296-314, 2003.

SORIN, C.; BUSSELL, J. D.; CAMUS, I.; LJUNG, K.; KOWALCZYK, M.; GEISS, G.; MCKHANN, H.; GARCION, C.; VAUCHERET, H.; SANDBERG, G.; BELLINI, C. Auxin and light control of adventitious rooting in *arabidopsis* require ARGONAUTE1. **Plant Cell**, v. 17, n. 5, p. 1343-1359, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 820 p.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; GONÇALVES G. R. D. Mini-cuttings and micro-cuttings rooting of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. clones as affected by IBA. **Revista Árvore**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.

WENDLING, I.; GATTO, A. **Substrato, adubação e irrigação na produção de mudas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 145 p.

WENDLING, I.; FERRARI, M.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de corticeira-domato (*Erythrina falcata* Bentham) por miniestaquia a partir de propágulos juvenis**. Embrapa Florestas, Colombo. 2005. 130 p. (Comunicado Técnico).

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influence of the serial mini-cutting technique on rooting vigor of *Eucalyptus grandis* clones. **Revista Árvore**, v. 29, n. 5, p. 681-689, 2005.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Production and survival of *Ilex paraguariensis* mini-cuttings and ministumps cultivated in semi-hydroponic system. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 289-292, 2007.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Mini-cuttings technique: a new ex vitro method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, v. 39, n. 3, p. 343-353, 2010.

WISE, F. C.; BLAZICH, F. A.; HINESLEY, L. Propagation of *Abies fraseri* by softwood stem cuttings. **Canadian Journal for Forest Research**, v. 15, p. 1172-1176, 1985.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A. D.; OLIVEIRA, M. L. D. Rooting of stem and leaf mini-cuttings in the vegetative propagation of Cedro Rosa (*Cedrela fissilis* VELL.). **Revista Árvore**, v. 27, n. 2, p. 139-143, 2003.

ZOBEL, B. Vegetative propagation in production forestry. **Journal of Forestry**, v. 90, n. 4, p. 29-34, 1992.

5 CHAPTER III

Genetic diversity within and among progeny of *Cabralea canjerana* (VELL. Mart.)

Abstract

Cabralea canjerana (VELL.) Mart., known as canjerana, is a tree species indigenous to southern Brazil and is very important for forest regeneration programs. The objective of this study was to assess the genetic diversity within and among progenies of three stock plants of canjerana, with previously defined species-specific SSR markers. Samples from young leaves of 32 seedlings had their DNA extracted to access the genetic diversity with eight SSR pairs of primers. Different alleles for each marker were visually identified in base pairs and a binary (1= allele present, 0= allele absent) scoring matrix was built for all the markers amplified in the samples. The allele frequency was calculated for each band and the heterozygosity and the polymorphic information content were calculated for each SSR pair of primers, progeny and for the combination of the 32 genotypes. All primer combinations were polymorphic and a high level of genetic diversity was found within and among progenies. There are genotypes from different stock plants that grouped together. Based upon these results, highly diverse clones may be identified in the progeny of a selected stock plant.

5.1 Introduction

Cabralea canjerana (VELL.) Mart. is a very important deciduous tree found in Brazil, Costa Rica, Guyana, Peru, Bolivia, Argentina and Paraguay (BACKES and IRGANG, 2002). Canjerana is a common species in some Atlantic Forest fragments, and a very important species for forest regeneration programs in degraded areas of Brazil (NOBREGA et al., 2008). Canjerana belongs to Meliaceae family, which is formed by 51 genera and almost 1,400 species (BARROSO, 1978). In Brazil, there are six genera and close to 100 species (SOUZA and LORENZI, 2005) in which stands out *C. canjerana* (VELL.) Mart. (KLEIN, 1984). This species is represented by three subspecies: *C. canjerana* subsp. *canjerana*, *C. canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss.), Penn and *C. canjerana* subsp. *selloi* (C.DC.) Barreiros, which diverges ecologically in relation to their niches that they occupy (PENNINGTON et al., 1981).

According to Carvalho (2006), in Rio Grande do Sul, Brazil, canjerana blooms from february to march and fructifies from july to december. One characteristic of this species is to have flowers and fruits simultaneously (PENNINGTON et al., 1981), being that the flowers are bisexual or unisexual and the plants are dioecious (MOSCHETA et al., 2002). Moreover, dioecious or separation of sexes in different plants of the same species is considered as the most efficient mechanism to prevent autopollination (FAEGRI and PIJL, 1971). It is not defined yet the chromosome number of canjerana, because of their small size. The only species of the Meliaceae family with defined number is *C. fissilis* with $2n=56$ chromosomes (GROSSI et al., 2011).

For both conservation and breeding efforts, the level of genetic diversity within and among populations is an important parameter. As a component of genetic diversity, the allelic richness identifies the number of alleles that are segregating in a population. Individuals that carry exclusive alleles have a singular importance in maintaining the heterozigity levels, when by means of the gene flow; these alleles are disseminated to other subpopulations (MELO, 2012). The same author mentioned the importance of measuring the genetic diversity among populations, which is the total number of alleles, because it is related to the capability of populations to adapt to environmental changes. In terms of diversity, allele richness unveils the quantity of segregating alleles in a locus and the allele frequency the presence of private alleles

of a specific population. The allelic richness in a particular locus and in the population also provides an estimation of genetic diversity (PETIT et al., 1998). Therefore, the measurement of the allele richness is an important parameter for the identification of which population should be prioritized for conservation and breeding efforts.

To complement conventional tree breeding programs and initiate the identification of potential improved genotypes, biotechnological tools, as the use of molecular marker to assess the degree of genetic diversity, have been successfully used in several programs of plant conservation (VARSHNEY and ANIS, 2014). Molecular genetic tools provide valuable information for conservation plans of biodiversity in long term (O'BRIEN, 1994). In this context, molecular markers can be useful by obtaining estimates of existing genetic differences (polymorphisms) among individuals from the same population, among populations and among species.

The molecular markers selected for genetic diversity studies are frequently simple sequence repeats (SSR, also termed microsattellites) (LITT and LUDY, 1989) due to their hypervariability, abundance, and relatively simple diagnostic polymerase chain reaction (PCR) procedure (POWELL et al., 1996). SSR markers are a group of sequence tagged sites (STSs) where primers of specific sequence are designed to flank hypervariable regions of di-, tri- or tetra-nucleotide repeats (LITT and LUDY, 1989). It is widely known that SSR markers are excellent tools for the genetic characterization of wild plant species and are abundant and well distributed in the eukaryotic genome. SSR markers are very powerful tools for unequivocal identification of cultivars due to their ubiquitous distribution among the eukaryotic genomes, their high level of polymorphism, their codominant inheritance, their high discrimination power and ease detection (MORGANTE and OLIVIERI, 1993). They have been described and developed as useful markers in a number of species, including canjerana (PEREIRA et al., 2011) with 32 pairs of primers already designed. The SSR markers evaluated in this study were already tested in another group of genotypes, and they were considered as a powerful tool for population genetic studies, including genetic diversity, spatial genetic structure, and gene flow. These data can help in the definition of conservation strategies and in the elaboration of a suitable management plan for the Atlantic Forest study area (PEREIRA et al., 2011).

The objective of this study was to assess the genetic diversity within and among progenies of three stock plants of canjerana with previously defined species-specific SSR markers.

5.2 Material and methods

Three selected stock plants, located far apart to prevent cross-pollination, were studied. To start the process, mature fruits (with reddish and yellowish color), were collected, packed in a sealed plastic bag and stored in a cool and dry environment until dehiscence (ROCHA et al., 2007). Seeds were extracted and sowed in pots with organic substrate. They were daily irrigated with water and, once a week after germination, with a nutrient solution with 50% concentration of salts as described by Wendling et al. (2007). Young leaves from 32 seedlings were collected and stored in -80°C until the extraction of DNA with the DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Valencia, California, USA). First, 0.1 g of lyophilized leaf tissue was disrupted with a mortar and pestle and added 600 μL of buffer AP1 and 4 μL of RNase. Sample was vortexed and incubated for 10 min at 65°C , when tubes were inverted two to three times during incubation. A total of 170 μL of buffer AP3 was added to the sample, mixed and incubated for 5 minutes on ice. The mixture was centrifuged for 5 minutes at 14,000 rpm and the lysate pipetted into a Qias shredder spin column placed in a 2 mL collection tube. In addition to this, the lysate was centrifuged for 2 minutes at 14,000 rpm. The flow-through was transferred into a new tube without disturbing the pellet, added 1.5 volumes of buffer AW1 and mixed by pipetting. 650 μL of the mixture was transferred into a DNeasy mini spin column and placed in a 2 mL collection tube. This mixture was centrifuged for 1 minute at 8,000 rpm and the flow-through was discarded (This step was repeated with the remaining sample). The spin column was placed into a new 2 mL collection tube. Then, 500 μL of buffer AW2 was added to the centrifuged mixture and centrifuged for 1 minute at 8,000 rpm and the flow-through was discarded (this step was repeated twice). The spin column was transferred to a new 2 mL microcentrifuge tube and added 100 μL of AE buffer for elution. Finally, the sample was incubated for 5 minutes at room temperature ($14 - 25^{\circ}\text{C}$) and centrifuged twice for 1 minute at 8,000 rpm.

After the extraction, the 32 samples from three stock plants had their DNA quantified with a Nanodrop 8 - Sample Spectrophotometer and the Genomic DNA was visualized with 1% agarose gel electrophoresis (EC - Apparatus Corporation and a Horizontal System for Submerged Gel Electrophoresis. EC-105). The eight SSR pairs of primers previously evaluated in canjerana by Pereira et al. (2011) were used for genetic diversity assessment (Table 11).

Table 11 - Sequences, size range of observed bands and annealing temperatures of eight canjerana SSR pairs of primers. MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.

Primers	Forward and Reverse primer sequences (5'→3')	Size range (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>Ccan04</i>	F: 6FAM- TCTACTGGTTATGGCTGTGC R: TGGTTGTCGTGTAGTGCAA	102-210	57
<i>Ccan11</i>	F: 6FAM- CTCAGCAGCAACAAGAGTA R: CAATGGTCGGACATCTTCCC	270-330	54
<i>Ccan17</i>	F: HEX- GAGAAGAGAAGGCTGTGTGC R: GAAACCTGATTCGTCTCGT	80-155	57
<i>Ccan18</i>	F: 6FAM- TGGTCCGAGGATCAAAACA R: TGGGGACGAAATGGAACCTG	75-400	56
<i>Ccan22</i>	F: 6FAM- GCCAAGATCCAGCTAATGCT R: GCTGTTTGCCTTCCCTAACT	70-280	57
<i>Ccan25</i>	F: HEX- GTGACAGAGCGAGATTCCAT R: CCCCTTCAGCTCCAAAATGT	60-550	58
<i>Ccan29</i>	F: HEX- CTTGCGATGGCAATCAAACC R: AGAAGGGCATAACCAGTTCT	160-380	52
<i>Ccan31</i>	F: HEX- CTCCTCGTTTTGCCACTCATT R: AAACAGAGGGTTTTCCGGTGC	180-600	57

DNA amplification was done in 15 μ L reactions containing 7.5 μ L GoTaq[®] Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 0.75 μ L of forward and reverse primer each, 5 μ L of free nuclease water, and 1 μ L of DNA template of the concentration. Amplifications were done in a Thermal Cycler (S1000 Thermal Cycler BIO-RAD) using the PCR cycle: initial denaturation: 5 minutes at 94°C; 35 cycles of 1 minute at 94°C, 1.30 minutes at annealing temperature (Table 11), 2 minutes at 72°C; and a final extension step of 10 minutes at 72°C.

For denaturing gels, the PCR products of 32 DNA samples were then size separated with 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (BIO-RAD Power PAC 3000 Eletrophorese) and stained with silver nitrate. Different alleles for each SSR band were visually identified in base pairs (bp) and a binary (1= allele

present, 0= allele absent) scoring matrix was built for all the SSR band amplified in the samples.

For each SSR pair of primers and for each progeny and combined canjerana populations, number of alleles, heterozygosity (H) (BOLSTEIN, 1980) and polymorphic information content (PIC) (SHETE et al., 2000) were calculated with the following formulas.

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \left[\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n P_i^2 P_j^2 \right]$$

n = number of alleles

P_i = frequency of i^{th} allele

With the allele frequencies, the unique alleles (UA), rare alleles (RA) and frequent alleles (FA) were obtained (Table 12). Cluster analysis was done with all the SSR allele data of all evaluated genotypes in the binomial data matrix with the McQuitty linkage and Euclidean distance in the statistical package MINITAB 14.

5.3 Results and discussion

In this study, the eight SSR pairs of primers were polymorphic (Table 11), even the SSRs primers *Ccan25* and *Ccan29* that were monomorphic with previous studied genotypes of canjerana (PEREIRA et al., 2011). As an example, the SSR pair of primer *Ccan11* shows a very high number of polymorphic alleles and high genetic diversity among the evaluated canjerana genotypes (Figure 15). This high genomic diversity with numerous alleles detected for single seedlings could be due to multiple loci and/or polyploidy origin of canjerana. This same pattern was confirmed by Melo (2002), that observed high values of heterozygosity, with a mean value of 0.685 in eight fragments of *C. canjerana* from the Environment Protection Area of Fernão Dias in Goiás, Brazil.

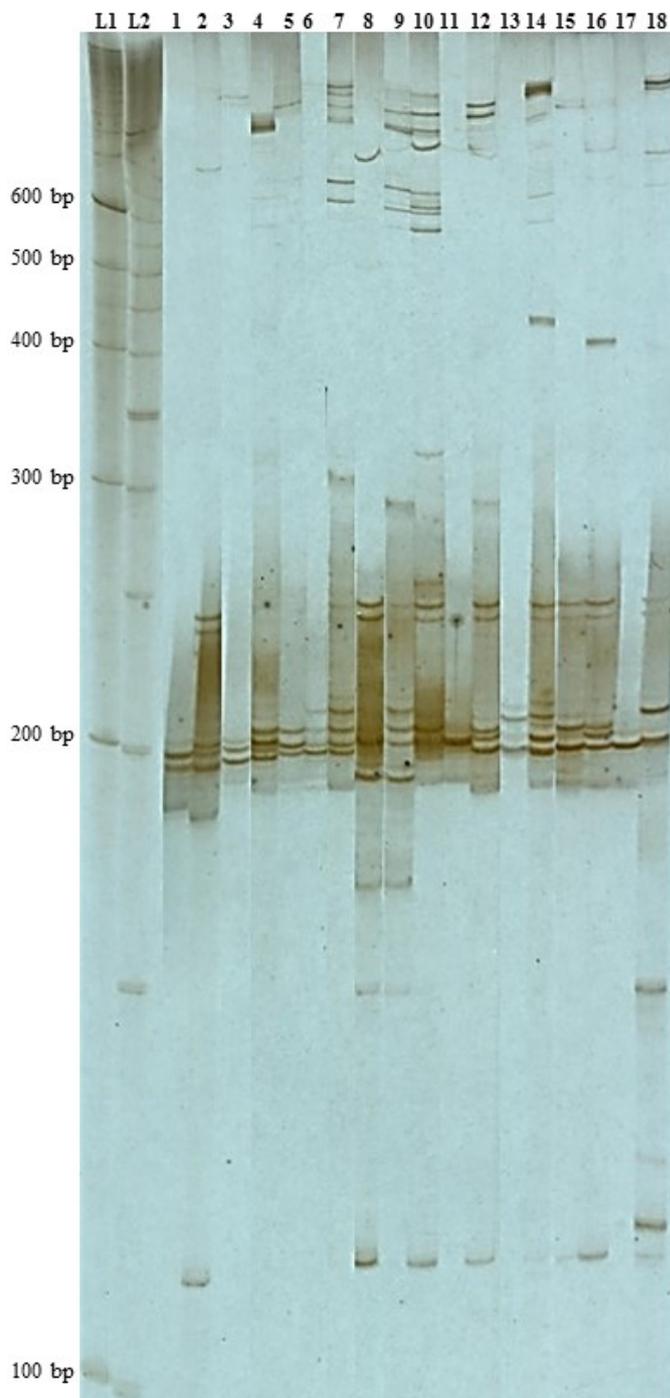


Figure 15 - A silver stained polyacrylamide gel image for the SSR marker *Ccan11*, species specific DNA marker for *Cabralea canjerana*. L1: 100 bp ladder, L2: 50 bp ladder, 1 to 18 are 18 individual trees subjected to PCR analysis. MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.

The PCR amplifications with primers of eight species-specific pairs of SSR primers had a total of 92 alleles detected among the 32 genotypes of canjerana (Table 12). The highest number of alleles was observed in the SSRs *Ccan17*,

Ccan04 and *Ccan29* with respectively 88, 81 and 76 alleles, being the most polymorphic ones. The heterozygosity values of these SSRs were 0.852, 0.885 and 0.862, which indicates a high level of genetic diversity. In relation to the heterozygosity value, six out of eight pairs of primers had a heterozygosity value higher than 0.80 and polymorphic information content higher or equal to 0.80. In addition, SSR *Ccan31* showed the highest value of heterozygosity (0.926) that is in agreement with previous works with other genotypes of canjerana from the southeastern region (PEREIRA et al., 2011) and from the south region of Minas Gerais (MELO, 2012), both areas in Brazil.

Table 12 – Abundance of allele and allelic frequency (Pi) for each allele and heterozygosity (H) and polymorphic information content (PIC) for each of the eight SSR pair of primers. MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.

Pair of Primers	Alleles / band (bp)	Abundance of allele	Pi	H	PIC
<i>Ccan04</i>	210	FA	0.06	0.885	0.874
	205	RA	0.04		
	202	FA	0.10		
	198	FA	0.15		
	196	RA	0.04		
	186	FA	0.10		
	112	UA	0.01		
	110	RA	0.02		
	108	FA	0.12		
	106	FA	0.10		
	104	FA	0.19		
	102	FA	0.07		
	<i>Ccan11</i>	330	UA		
325		UA	0.02		
320		UA	0.02		
315		FA	0.06		
310		UA	0.02		
305		UA	0.02		
300		FA	0.17		
295		FA	0.06		
290		FA	0.06		
285		FA	0.17		
280		FA	0.17		
275		FA	0.19		
270		RA	0.04		
<i>Ccan17</i>	155	FA	0.07	0.852	0.834
	150	FA	0.18		
	148	FA	0.18		
	140	FA	0.10		
	130	FA	0.07		
	90	FA	0.18		
	88	FA	0.17		
<i>Ccan18</i>	80	RA	0.05	0.618	0.559
	400	FA	0.09		
	280	FA	0.30		

	180	UA	0.04		
	90	FA	0.52		
	75	UA	0.04		
<i>Ccan22</i>	280	FA	0.50	0.702	0.667
	90	UA	0.13		
	80	UA	0.13		
	75	UA	0.13		
	70	UA	0.13		
<i>Ccan25</i>	550	UA	0.03	0.818	0.799
	500	UA	0.03		
	470	RA	0.05		
	460	UA	0.03		
	430	UA	0.03		
	380	FA	0.32		
	370	FA	0.27		
	320	UA	0.03		
	300	UA	0.03		
	280	UA	0.03		
	270	FA	0.08		
	260	UA	0.03		
	100	UA	0.03		
	60	UA	0.03		
<i>Ccan29</i>	380	UA	0.01	0.862	0.848
	350	RA	0.05		
	340	FA	0.17		
	330	FA	0.12		
	320	RA	0.04		
	310	FA	0.13		
	280	UA	0.01		
	275	UA	0.01		
	270	RA	0.03		
	265	FA	0.09		
	250	UA	0.01		
	240	RA	0.03		
	230	UA	0.01		
	220	RA	0.03		
	180	FA	0.24		
	160	UA	0.01		
<i>Ccan31</i>	600	FA	0.13	0.926	0.922
	500	UA	0.03		
	430	UA	0.03		
	350	UA	0.03		
	250	RA	0.05		
	245	RA	0.05		
	240	UA	0.03		
	235	UA	0.03		
	230	FA	0.18		
	225	FA	0.08		
	220	RA	0.05		
	215	UA	0.03		
	210	UA	0.03		
	205	RA	0.05		
	200	FA	0.08		
	195	RA	0.05		
	190	UA	0.03		
	185	UA	0.03		
	180	RA	0.05		

P_i: Allele frequency, *H*: Heterozygosity, *P_{IC}*: Polymorphic Information Content, FA: Frequent allele, RA: Rare allele and UA: Unique allele {allele frequency is based when an allele is present in only one individual is considered as a UA; present in ≤5% of the individuals as a RA; >5% as a FA}.

From the 92 detected alleles in the 32 genotypes of canjerana, 37 were unique (found only in a single genotype), 17 were rare (with a frequency of less than 5%), and 38 were frequent (present in more than 5% of the evaluated genotypes) (Table 12). The observed heterozygosity was high in all genotypes, ranging from 0.618 to 0.926. Besides the highest heterozygosity, the SSR *Ccan31* also showed the highest polymorphic information content. The high number of alleles combined with the high values of heterozygosity and polymorphic information content are all indications of the presence of high genetic diversity among the genotypes representing the progeny of three-canjerana stock plants.

The progenies 1 and 2 showed a greater number of alleles than the progeny 3 (Table 13). The heterozygosity and the polymorphic information content are similar among progenies and the combined genotypes of canjerana. The results of this analysis showed the presence of a high genetic diversity within progeny, similar to the one considering all canjerana genotypes of the three-progeny together. It indicates that it is possible to keep high level of genetic diversity selecting genotypes produced in one or few progenies, because of the high genetic diversity present in one progeny.

Table 13 - Number of alleles, heterozygosity and polymorphic information content (PIC) for eight pairs of SSR primers in each progeny and combined genotypes of canjerana. MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.

Progeny of Stock Plants	Number of Alleles	Heterozygosity	PIC
Progeny 1			
<i>Ccan 04</i>	32	0.888	0.872
<i>Ccan 11</i>	23	0.835	0.815
<i>Ccan 17</i>	35	0.852	0.835
<i>Ccan 18</i>	7	0.571	0.501
<i>Ccan 22</i>	3	0.666	0.592
<i>Ccan 25</i>	12	0.694	0.643
<i>Ccan 29</i>	30	0.811	0.785
<i>Ccan 31</i>	9	0.814	0.795
Mean	18.88	0.766	0.729
Progeny 2			
<i>Ccan 04</i>	28	0.839	0.821
<i>Ccan 11</i>	24	0.871	0.855
<i>Ccan 17</i>	32	0.816	0.787
<i>Ccan 18</i>	12	0.666	0.621
<i>Ccan 22</i>	5	0.559	0.499
<i>Ccan 25</i>	20	0.865	0.852
<i>Ccan 29</i>	35	0.869	0.858
<i>Ccan 31</i>	19	0.914	0.905
Mean	21.88	0.799	0.774

Progeny 3			
<i>Ccan 04</i>	21	0.893	0.885
<i>Ccan 11</i>	6	0.499	0.446
<i>Ccan 17</i>	21	0.857	0.841
<i>Ccan 18</i>	4	0.499	0.375
<i>Ccan 22</i>	0	--	--
<i>Ccan 25</i>	5	0.639	0.563
<i>Ccan 29</i>	11	0.876	0.863
<i>Ccan 31</i>	11	0.876	0.861
Mean	9.87	0.767	0.604
Combined			
<i>Ccan 04</i>	81	0.885	0.874
<i>Ccan 11</i>	53	0.865	0.851
<i>Ccan 17</i>	88	0.852	0.834
<i>Ccan 18</i>	23	0.618	0.559
<i>Ccan 22</i>	8	0.702	0.667
<i>Ccan 25</i>	37	0.818	0.799
<i>Ccan 29</i>	76	0.862	0.848
<i>Ccan 31</i>	26	0.926	0.922
Mean	49	0.816	0.794

The dendrogram based upon the Euclidean distance also showed high genetic diversity within and among stock plants (Figure 16). There were genotypes from different progeny grouping together showing that even a small group of individuals of one progeny encloses high levels of diversity. As a consequence of this high genetic diversity in one progeny, it was not possible to group together all genotypes from the same stock plant. It was also found four genotypes that were not differentiated. Besides the high polymorphism, it is possible that the two pairs of the genotypes (SiMSPP3 and SiMSPP11) from one stock plant and (SMSPP6 and SMSPP10) only differ in regions of the genome different from those where the SSR markers were designed. It is very uncertainty that they are the same genotype, since all plants come from different seed and where not propagated. Therefore, polyploidy in canjerana can ensure the conservation of this species in their natural habitat and its use in selection in breeding programs of superior genotypes of canjerana.

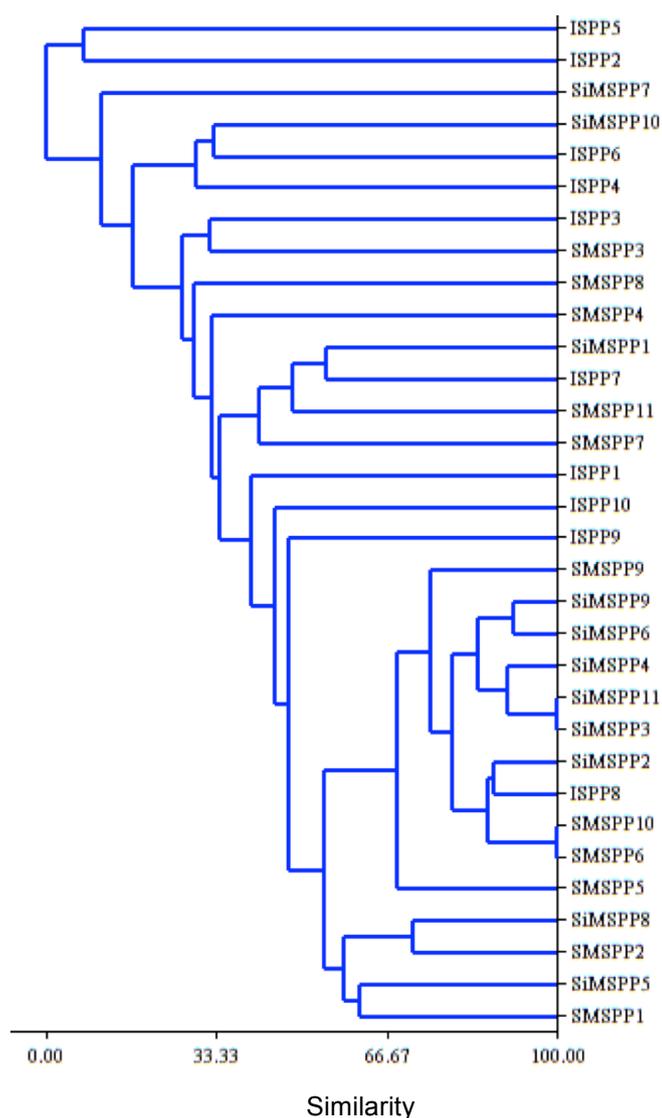


Figure 16 - Dendrogram representing molecular similarity of 32 seedlings of canjerana from three different stock plants (SMSPP = Stock Plant 1, SiMSPP = Stock Plant 2 and ISPP = Stock Plant 3). MSU, East Lansing, MI, USA, 2013.

5.4 Conclusion

All SSR primer combinations were polymorphic and a high level of genetic diversity was found within and among progenies. There are genotypes from different stock plants that grouped together. Based upon these results, highly diverse clones may be identified in the progeny of selected stock plants of canjerana.

5.5 References

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do sul**: guia de identificação e interesse ecológico. Porto Alegre: Instituto Souza Cruz. 2002. 326 p.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: EDUSP. v. 1. 1978. 255 p.

BANDINELLI, M. G.; BISOGNIN, D. A.; GNOCATO, F. S.; MAMBRIN, R. B.; SAUSEN, D.; NICOLOSO, F. T. MS salt and sucrose concentrations in the *in vitro* multiplication and acclimatization of potato. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 242-247, 2013.

BOLSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKALNICK, M. H.; DAVIES, R. W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Embrapa informação tecnológica; Colombo: Embrapa Floresta, v. 2, 2006, 628 p.

FAEGRI, K.; PIJL, L. **The principles of pollination ecology**. Oxford, Pergamon. 1971. 291 p.

GROSSI, J. A.; GODOY, S. M.; MACEDO, C. R., PAULA, G. B. N.; ROMAGNOLO, M. B.; RISSO-PASCOTTO, C. Comportamento meiótico durante a microsporogênese em espécies da família Meliaceae. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, Umuarama, v. 14, n. 1, p. 51-56, 2011.

KLEIN, R. M. Meliáceas. In: **Flora lustrada Catarinense**. R. Reitz. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. p. 65-83, 1984.

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

MELO, A. T. O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de mata atlântica**. 2012. 88 f. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Goiás.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. PCR- Amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.

MOSCHETA, I. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; ROSA, S. M. Morfo-anatomia e aspectos da biologia floral de *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart. (Meliaceae). **Acta Científica Venezuelana**, v. 53, n. 4, p. 239-244, 2002.

NOBREGA, A. M. F.; VALERI, S. V.; PAULA, R. C.; SILVA, S. A. Natural regeneration in forest remainders and reforested areas of Mogi-Guaçu river floodplain in Luiz Antônio county, São Paulo, Brasil. **Revista Árvore**, v. 32, n. 5, p. 909-920, 2008.

O'BRIEN, S. J. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proceedings of the National Academic Science**, v. 91, n. 13, p. 5748-5755, 1994.

PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. D.; TAYLOR, D. A. H. Meliaceae. **Flora Neotropica Monograph**, v. 28, p. 235-244, 1981.

PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO, A. J. V.; COELHO, A. S. G.; CIAMPI, A. Y.; FRANCESCHINELLI, E. V. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cabralea canjerana* (MELIACEAE) **American Journal of Botany**, v. 98, n. 1, p. e10-e12, 2011.

PETIT, R. J.; MOUSADIK, A.; PONS, A. O. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, Gainesville. v. 12, n. 4, p. 844-855, 1998.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science**, v. 1, p. 215-221, 1996.

ROCHA, S. C.; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

SHETE, S.; TIWARI, H.; ELSTON, R. C. On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. **Theoretical Population Biology**, v. 57, p. 265-271, 2000.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Instituto Plantarum. 2005. 639 p.

VARSHNEY, A.; ANIS, M. **Trees: propagation and conservation (Biotechnological approaches for propagation of a multipurpose Tree, *Balanites aegyptiaca* Del.)** New Delhi: Springer. 2014. 116 p.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Production and survival of *Ilex paraguariensis* minicuttings and ministumps cultivated in semi-hydroponic system. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 289-292, 2007.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em espécies florestais nativas, o uso da propagação vegetativa se justifica para aquelas que apresentam restrições para a produção de mudas seminais pelas dificuldades encontradas para a obtenção e o armazenamento das sementes, o que muitas vezes estão ainda associados a dormência e ao baixo poder germinativo. O poder germinativo das sementes de canjerana é relativamente alto, porém se mantém poucos dias após o beneficiamento dos frutos. Este trabalho foi conduzido com o objetivo geral de desenvolver a micropropagação para auxiliar a conservação e multiplicação de genótipos superiores, estudar a microestaquia e miniestaquia para a produção massal de mudas, e avaliar a diversidade genética entre e dentro de três matrizes selecionadas da canjerana.

Inicialmente foram coletados frutos maduros das três árvores matrizes e beneficiadas as sementes para o desenvolvimento de protocolos de desinfestação e estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas de canjerana. Na desinfestação de sementes, foram avaliadas as concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de hipoclorito de sódio e inoculadas em 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado a 5,8. Os resultados mostraram que sementes podem ser tratadas com solução de 7,5% de hipoclorito de sódio por tempos de 10 a 30 minutos sem serem prejudicadas a germinação e o vigor das sementes. O crescimento destas plântulas assépticas foi avaliado em três diferentes meios de cultura (MS, WPM e ½ MS) e verificou-se que as plântulas podem ser cultivadas tanto em meio de cultura WPM quanto em meio MS.

Já na fase de multiplicação, foram executados três experimentos com citocininas e segmentos nodais oriundos da multiplicação de plântulas assépticas. O primeiro experimento objetivou identificar o tipo de segmento e a necessidade do uso de BAP nos experimentos de multiplicação. Os resultados mostraram que o segmento basal e o intermediário podem ser usados como explantes na fase de multiplicação e que o BAP não aumenta as brotações adventícias. No segundo experimento testaram-se três diferentes citocininas (BAP, KIN e TDZ), não havendo resposta significativa nos tratamentos e tendo o BAP como o melhor tratamento. No terceiro experimento testaram-se as concentrações de 0; 1; 3; 6; 9 e 12 µM de BAP

havendo resposta significativa somente a partir da dose de 3 μM . Cabe ressaltar que a taxa de multiplicação de canjerana foi baixa nos três experimentos, não obtendo-se uma média superior a 1 brotação por segmento nodal.

Com as microcepas formadas pelo sistema radicular e parte da parte aérea das plântulas não utilizadas para o preparo dos segmentos nodais foram avaliadas a manutenção em dois meios de cultura (WPM e MS) e observou-se que a maior porcentagem de sobrevivência ocorreu em meio WPM e não houve resposta significativa no número de microestacas produzidas por microcepa entre os meios de cultura. Já as microestacas produzidas foram submetidas a dois meios de cultura com duas auxinas e observou-se que a adição de 5 μM de ANA ao meio de cultura aumentou o enraizamento após dois meses de cultivo *in vitro*. Este mesmo tratamento resultou em maior sobrevivência das microestacas enraizadas *in vitro* durante a aclimatização em casa de vegetação. Estas plantas aclimatizadas podem ser utilizadas para estabelecer um microjardim clonal em casa de vegetação. Portanto, a microestaquia de canjerana tem potencial para a manutenção de germoplasma *in vitro*, o que facilita a produção de um maior número de indivíduos de cada genótipo, acelerando o processo de identificação de genótipos superiores, bem como de obtenção de plantas matrizes vigorosas para o estabelecimento do microjardim clonal.

Para avaliar a possibilidade de produção de mudas de canjerana por miniestaquia, um minijardim com três clones foi estabelecido em sistema de cultivo sem solo. Segmentos nodais com 1,5 a 2 cm de comprimento e um folíolo cortado pela metade possuem maior competência para o enraizamento quando comparado com os apicais. Os clones avaliados de canjerana diferem, tanto na competência para o enraizamento quanto na taxa de sobrevivência das miniestacas. A combinação de iguais proporções de substrato comercial (a base de casca de pinus), areia grossa e casca de arroz carbonizada resulta em maior porcentagem de enraizamento de miniestacas. Miniestacas de canjerana devem ser tratadas com 3000 mg L⁻¹ de AIB para maximizar o enraizamento. Após a aclimatização em casa de vegetação, miniestacas enraizadas poderão ser transferidas para minijardim clonal ou aclimatizadas em área a pleno sol para o estabelecimento e avaliação a campo.

Para avaliar a diversidade genética de progênies de três árvores matrizes selecionadas foram utilizados oito pares de primers SSR desenvolvidos para a

canjerana. Todos os pares de primers foram polimórficos nos genótipos avaliados, o que justifica a utilização destes marcadores específicos para a canjerana. Também observou-se que genótipos de diferentes plantas matrizes se agruparam entre si e, com base no nível de polimorfismo encontrado, clones com alta variabilidade genética podem ser identificados mesmo dentro da progênie de uma planta matriz selecionada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009. 500 p.

ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONÇALVES, S. I. Propagação por microestaquia. In: 7 CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1992. p. 824-836

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: 11 REUNIÃO TÉCNICA DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA, 1 REUNIÃO DE SILVICULTURA CLONAL, 1996, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. p. 1-9.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *EUCALYPTS*, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 1. p. 300-304.

ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. (EDS.) *Plantation forest biotechnology for the 21th century. Research Signposts...* Kerala, India, 2004. p. 303-333.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação e interesse ecológico. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz, 2002. p. 200-201.

BANDINELLI, M. G. **Micropropagação e miniestaquia de batata**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2009.

BARREIROS, H. D. S.; SOUZA, D. S. E. Notas geográficas e taxonômicas sobre *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart. no Brasil (Meliaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 46, n. 1, p. 17-26, 1986.

BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de Plantas**. EMBRAPA Brasília, DF: Informação Tecnológica, 2010. 303 p.

BISOGNIN, D. A. Produção de plantas matrizes de morangueiro. In: SEMINÁRIO SOBRE O CULTIVO HIDRÔNICO DE MORANGUEIRO, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria: UFSM, CCR, Departamento de Fitotecnia, 2007. p. 9-17.

BISOGNIN, D. A. Breeding vegetatively propagated horticultural crops. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, p. 35-43, 2011.

BLACK, S.; ERICSSON, G.; GUSTAFSSON, L.; LUNDKVIST, K. Ecological genetics of the rare species *Vicia pisiformis*: quantitative genetic variation and temperature response in biomass and fecundity. **Acta Oecologica**, v. 16, p. 261-275, 1995.

BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances in genetics**, v. 13, p.115-155, 1965.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 106, n. 4, p. 515-518, 1981.

BREMER, B.; BREMER, K.; Chase, M. W.; FAY, M. F.; REVEAL, J. L.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.

BRONDANI, G. E.; HOFFMANN, J. M. E.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Determinação do teor de carboidratos em minicepas de *Eucalyptus benthamii*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 51-60, 2012.

CARMO, R. M. **Biologia reprodutiva de *Cabralea canjerana* ssp. canjerana e a influência do tamanho do fragmento florestal no sucesso reprodutivo e diversidade genética**. 2005. 108 f. (Tese de Doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARPANEZZI, A. A. et. al. **Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. Embrapa CNPF, 1988. 70 p. (Documentos, 20).

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas; Colombo: Embrapa Florestas, v. 2, 2006. 628 p.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A. S. **Plantas matrizes na propagação vegetativa**. Embrapa Algodão, 2012. 36 p. (Documentos 242).

CASTIGLIONI, J. A. Descripción botánica, forestal y tecnológica de las principales espécies indígenas de la Argentina. In: COZZO, D. **Arboles forestales, maderas y silvicultura de la Argentina**. Buenos Aires: Acme, 1975. p. 38-60.

CASTRO, P. R. C. Mecanismo de ação auxínica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 36, 1979. p. 621-634.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1199-1205, 2010.

COSTA, L. G. S.; MANTOVANI, W. Flora arbustivo-arbórea de trecho de mata mesófila semidecídua, na Estação Ecológica de Ibicatu, Piracicaba São Paulo. **Hoehnea**, v. 22, n. 1/2, p. 47-59, 1995.

COSTA, G. S do.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.

CUNHA, A. C. M. C.; WENDLING, I.; JUNIOR, L. S. Miniestaquia em sistema de hidroponia e em tubetes de corticeira do mato. **Ciência Florestal**, Santa Maria, 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 enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 3, p. 591-599, 2009.

DEB C. R.; IMCHEN, T. An efficient *in vitro* hardening of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, v. 9, p. 79-83, 2010.

DIAS, P. C.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; PAIVA, H. N.; CORREIA, 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.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. **Recomposição de matas ciliares**. São Paulo: Instituto Florestal, 1990. 14 p.

DURLO, M. A.; DENARDI, L. Morfometria de *Cabralea canjerana*, em mata secundária nativa do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 55-66, 1998.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. 312 p.

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

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

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **Scientia Florestalis**, v. 45, p. 22-30. 1992.

FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; NOGUEIRA, A. C. Miniestaquia de *Sapium glandulatum* (VELL.) Pax com o uso de ácido indolbutírico e ácido naftaleno acético. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 1, p. 19-31, 2010.

FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal 2**. 2ª Ed. São Paulo: EPU. 1985. 401 p.

FICK, T. A.; BISOGNIN D. A.; QUADROS, K. M. de.; HORBACH, M.; REINIGER, L. R. S. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de Louro Pardo (*Cordia trichotoma*) *in vitro*. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; NILSON, A. D.; LEONHARDT, C. Aspectos da propagação de *Persea willdenovii* Kosterm. **Rodriguésia**, v. 58, n. 1, p. 27-44, 2007.

FLORIANO, E. P. Produção de mudas por via assexuada. In: **Produção de Sementes e mudas florestais**. 2. ed. Santa Maria, UFSM, 2004. 388 p. (Caderno didático, 1).

FRASSETTO, E. G.; MENEZES, N. L. Influência da temperatura de germinação, da abertura dos frutos e da embalagem na viabilidade de sementes de canjerana *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart. Meliaceae. **Informativo ABRATES**, v. 7, n. 1/2, 213 p. 1997.

FUZETO, A. P.; BARBOSA, A. A. A.; LOMÔNACO, C. *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adri. Juss.) Penn. (Meliaceae), uma espécie dióica. **Acta botanica brasílica**, v 15, n. 2, p. 167-175, 2001.

GALVÃO, F. **Variação sazonal da fotossíntese líquida e respiração de *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart., *Ilex paraguariensis* St. Hil. e *Podocarpus lambertii* Kl. em função da intensidade luminosa e temperatura.** 1986. 116 f. (Tese de Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y. S.; RODERJAN, C. V. Levantamento fitossociológico das principais associações arbóreas da Floresta Nacional de Irati-PR. **Floresta**, v. 19, n. 1/2, p. 30-49, 1989.

GLÉMIN, S.; BAZIN, E.; CHARLESWORTH, D. Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. **Proceedings of the Royal Society Series B – Biological Sciences**, v. 273, p. 3011-3019, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: CBAB-EMBRAPA, 1998, p.183-260.

GRATIERI-SOSSELLA, A.; PETRY, C.; NIENOW, A. A. Propagação da corticeira do banhado (*Erythrina crista-galli* L.) (Fabaceae) pelo processo de estaquia. **Revista Árvore**, v. 32, n. 1, p. 163-171, 2008.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices.** 8th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 928 p.

HIGA, A. R.; HIGA, R. C. V.; IKEDA, A. C. O melhoramento florestal e a propagação vegetativa nos novos cenários. In: I SIMPÓSIO DE MELHORAMENTO E PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE PLANTAS, 2011, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM/MPVP, 2011. p. 300-308.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Circular Técnica IPEF**, São Paulo, n. 192, 14 p. 2000.

HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P.; QUADROS, K. M. de.; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de erva mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 113-119, 2011.

IANNELLI, C., XAVIER, A., COMÉRIO, J. Micropropagação de *Eucalyptus* na Champion. **Silvicultura**, v. 66, p. 33-35, 1996.

JANKOWSKY, I. P.; CHIMELO, J. P.; CAVANCANTE, A. de A.; GALINA, I. C. M.; NAGAMURA, J. C. S. **Madeiras brasileiras**. Caxias do Sul: Spectrum, 1990. 172 p.

KÄMPF, A.; JUNG, M. The use of carbonized rice hulls as an horticultural substrate. **Acta Horticulture**, v. 294, p. 271-281, 1991.

KIELSE, P. **Propagação vegetativa de louro-pardo *Cordia trichotoma* (VELL.) ARRAB. EX STEUD. por estaquia radicular e miniestaquia**. 2012. 117 f. (Tese de Doutorado), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

LIMA, D. M.; TANNO, G. N.; PURCINO, M.; BIASI, L. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; ZANETTE, F. Enraizamento de miniestacas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) em diferentes substratos. **Ciência Agrotécnica**, v. 33, n. 2, p. 617-623, 2009.

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

LONGHI, R. A.; MARQUES, S. E.; BISSANI, V. Época de colheita, tratamento de sementes e métodos de semeadura utilizados no viveiro florestal de Nova Prata. In: 5 CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 1984, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: 1984. v. 2, p. 533-553.

LONGHI, R. A. **Livro das árvores e arvoretas do sul**. Porto Alegre: L&PM, 1995. p. 51-52.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 360 p.

LORTIE, C. J.; AARSEN, L. W. The specialization hypothesis for phenotypic plasticity in plants. **International Journal of Plant Science**, v. 157, p. 484-487, 1996.

MACHADO, M. P.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L. A. Application of IBA on *in vitro* and *ex vitro* rooting microcutting of *Lavandula angustifolia* Miller. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 153-161, 2013.

MARCHETTI, E. R. Época de coleta, semeadura, tratamento pré-germinativo e métodos de semeadura de espécies florestais cultivadas no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 5., 1984, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata, 1984. v. 2, p. 524-532.

MARTINS-CORDER, M. P.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wild. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

MARTINS, J. P. R.; SANTOS, B. R.; BARBOSA, S.; MÁXIMO, W. P. F.; BEIJO, L. A.; PAIVA, R. Crescimento e aspectos sintomatológicos na aclimatização de ipê roxo. **Cerne**, v. 17, n. 4, p. 435-442, 2011.

MOSCHETA, I. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; ROSA, S. M. Morfo-anatomia e aspectos da biologia floral de *Cabralea canjerana* (VELL.) Mart. (Meliaceae). **Acta Científica Venezuelana**, v. 53, n. 4, p. 239-244, 2002.

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

ORTEGA, L. S. Temperamento de luz de los arboles del alto Paraná y potencial de regeneración forestal. **Ka'a guy**, v. 11, n. 1, p. 16-20, 1995.

PAIM, A. F. **Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. e *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos.** 2011. 79 f. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2011.

PAIVA, H. N.; GONÇALVES, W. **Produção de mudas.** Viçosa: Aprenda Fácil, 2001. 149 p. (Coleção Jardinagem e Paisagismo. Série Arborização Urbana 1).

PARANÁ. Universidade Federal do Paraná. Centro de Pesquisas Florestais. **Estudo das alternativas técnicas, econômicas e sociais para o setor florestal do Paraná: sub-programa tecnologia.** Curitiba, 1979. 335 p.

PENCHEL, R. M. Uso da propagação vegetativa no melhoramento. In: V Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2009, Guarapari, Espírito Santo. **Minicurso**, 2009.

PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. D.; TAYLOR, D. A. H. Meliaceae. **Flora Neotropica Monograph**, v. 28, p. 235-244, 1981.

PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO, A. J. V.; COELHO, A. S. G.; CIAMPI, A. Y.; FRANCESCHINELLI, E. V. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cabralea canjerana* (MELIACEAE). **American Journal of Botany**, v. 98, n. 1, p. e10-e12, 2011.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science**, v. 1, p. 215-221, 1996.

PRENTICE, H. C.; LONN, M.; LEFKOVITCH, L. P.; RUNYEON, H. Associations between allele frequencies in *Festuca ovina* and habitat variation in the alvar grasslands on the Baltic Island of Oland. **Journal of Ecology**, v. 83, p. 391-392, 1995.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. SUDESUL-HBR. Porto Alegre, CORAG, 1988, 525 p.

RIZZINI, C. T. A germinação de *Cabralea polytricha* Juss. em confronto com *C. laevis* C. D. C. (MELIACEAE). **Leandra**, v. 6-7, n. 7, p. 23-33, 1977

RIZZINI, C. M.; ADUAN, R. E.; JESUS, R. de.; GARAY, I. Floresta pluvial de tabuleiro, Linhares, ES, Brasil: sistemas primários e secundários. **Leandra**, v. 12, p. 54-76, 1997.

ROCHA, S. C.; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

RODRIGUES, L. R.; FIOR, C. S.; LEONHARDT, C.; SILVA, L. C.; NILSON, A. D. Ensaio com o cultivo *in vitro* de explantes nodais de canela-sebo (*Persea venosa* Nees & Martius ex Nees). **Iheringia**, v. 50, p. 99-112, 1998.

RONDON NETO, R. M.; BOTELHO, S. A.; DAVIDE, A. C.; FONTES, M. A. L.; FARIA, J. M. R. Estudos básicos para propostas de tratamentos silviculturais para acelerar o processo de recomposição da vegetação de uma clareira de formação antrópica, em Lavras-MG. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO FLORESTAL DO CONE-SUL, 1999, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1999. p. 165-176.

SAKITA, M. N.; VALLILO, M. I. Estudos fitoquímicos preliminares em espécies florestais do Parque Estadual do Morro do Diabo. **Revista do Instituto Florestal**, v. 2, n. 2, p. 215-226, 1990.

SANCHOTENE, M. C. C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Editora FEPLAM, Porto Alegre, 1985. 311 p.

SCHEINER, S. M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 35-68, 1993.

SCHIMITZ, J. A. K.; SOUZA P. V. D. D.; KAMPF, A. N. Physical and chemical properties of substrates with mineral and organic origin for growth of potted plants. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 937-944, 2002.

SCHUCH, M. W.; ROSSI, A.; DAMIANI, C. R.; SOARES, G. C. AIB e substrato na produção de mudas de mirtilo cv. "Climax" através de microestaquia. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1446-1449, 2007.

SERAFINI, L. A.; L. A.; BARROS, N. M. de.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnology na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba RS: Ed. Agropecuária, 2001. 463 p.
SFB. **Florestas do Brasil em Resumo 2010**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro. MMA 2011. 156 p. Disponível em http://www.mma.gov.br/estruturas/sfb/_arquivos/livro_de_bolso___sfb_mma_2010_web_95.pdf

SFB. **Florestas do Brasil em Resumo 2013**: Dados de 2007-2012. Serviço Florestal Brasileiro. Brasília: SFB, 2013. 188 p. Disponível em https://florestas dofuturo.files.wordpress.com/2013/06/florestas_do_brasil_em_resumo_2013.pdf

SILVA, F. C. da.; MARCONI, L. P. **Fitossociologia de uma floresta com araucária em Colombo-PR**. Embrapa Florestas, Colombo-PR, 1990. p. 23-38 (Boletim de Pesquisa Florestal, 20).

SILVA, L. F. Propagação vegetativa do eucalipto: experiência da International Paper do Brasil. **IPEF Notícias**, v. 25, n. 156, p. 4-5, 2001.

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

SIMÃO, Salim. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760 p.

SINGH, N. K.; SEHGAL C. B. Micropropagation of “Holy basil” (*Ocimum sanctum* L.) from young inflorescences of mature plants. **Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 161-166, 1999.

SMART, D. R.; KOCSIS, L.; WALKER, M. A.; STOCKERT, C. Dormant buds and adventitious root formation by *Vitis* and other woody plants. **Journal of Plant and Growth Regulators**, v. 21, p. 296-314, 2003.

SOUSA-SILVA, J. C.; SALGADO, M. A. S. de.; FELFILI, J. M.; REZENDE, A. V.; FRANCO, A. C. Desenvolvimento inicial de *Cabralea canjerana* em diferentes condições de luz. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, v. 4, p. 80-89, 1999.

SOUZA, JUNIOR. L.; QUOIRIN, M.; WENDLING, I. Miniestaqueia de *Grevillea robusta* A. Cunn. a partir de propágulos juvenis. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 4, p. 455-460, 2008.

TABARELLI, M. Flora arbórea da floresta estacional baixo-montana no Município de Santa Maria-RS, Brasil. In: 2 CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p. 260-268. (Publicado na Revista do Instituto Florestal, v. 4, parte 1, edição especial, 1992).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 820 p.

THOMPSON, J. D. Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 246-249, 1991.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini-cutting and micro-cutting techniques. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 109-117, 2006.

VACCARO, S.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Aspectos da composição florística e categorias sucessionais do estrato arbóreo de três subseres de uma floresta estacional decidual, no Município de Santa Tereza - RS. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 1, p. 1-18, 1999.

VARSHNEY, A.; ANIS, M. **Trees: propagation and conservation (Biotechnological approaches for propagation of a multipurpose Tree, *Balanites aegyptiaca* Del.)** New Delhi: Springer. 2014. 116 p.

VIA, S. Adaptive phenotypic plasticity: target or byproduct of selection in a variable environment. **The American Naturalist**, v. 142, p. 352-365, 1993.

VIA, S.; GOMULKIEWICZ, R.; DEJONG, G.; SCHEINER, S. M.; SCHLICHTING, C.D.; VAN TIENDEREN, P.H. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, p. 212-217, 1995.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p.187-194, 2001.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. **Curso Intensivo de Viveiros e Produção de Mudás**. EMBRAPA, 2002. (Documentos 79).

WENDLING, I.; GATTO, A. **Substrato, adubação e irrigação na produção de mudas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 145 p.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones *Eucalyptus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 475-480, 2003.

WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire), por miniestaquia de material juvenil**. In: 3º Congresso sul-americano da erva-mate. Chapecó, Santa Catarina. 1a Feira do Agronegócio da erva mate, 2003. CD-ROM.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 289-292, 2007.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Mini-cuttings technique: a new ex vitro method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, v. 39, p. 343-353, 2010.

WENDLING, I.; PINTO JÚNIOR, J. E. A ampliação dos cultivos clonais e da demanda por mudas de espécies florestais. In: I SIMPÓSIO DE MELHORAMENTO E PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE PLANTAS, 2011, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria/MPVP, 2011. p. 293-299.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A., COMÉRIO, J.; IANNELLI, C. M. Eficiência da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA-PR, 1997. v. 4, p. 40-45.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa, MG: SIF, 1998. 10 p. (Informativo Técnico SIF, 11).

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

XAVIER, A.; SANTOS, G. A. D.; OLIVEIRA, M. L. D. Enraizamento de miniestacas caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* VELL.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 351-356, 2003.

XAVIER A.; WENDLING I.; SILVA R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 276 p.

APÊNDICES

Apêndice - 1. Resumo da análise de variância para a porcentagem de desinfestação de sementes de canjerana em função das combinações de concentrações (0; 2,5; 5; 7,5 e 10% NaOCl) e tempos de imersão (10; 20 e 30 min), avaliados aos 14 dias de cultivo *in vitro* em meio de germinação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CONCENTRAÇÕES	4	3647,0275	911,7569	1294,9414 **
TEMPOS DE IMERSÃO	2	119,7202	59,8601	85,0176 **
CONCENTRAÇÕES X TEMPOS	8	21989,3306	2748,6663	3093,8948 **
(TRATAMENTOS)	14	25756,0783	1839,7199	
RESIDUO	45	31,6841	0,7041	

Apêndice - 2. Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação de sementes de canjerana em função das combinações de concentrações (0; 2,5; 5; 7,5 e 10% NaOCl) e tempos de imersão (10; 20 e 30 min), avaliados aos 14 dias de cultivo *in vitro* em meio de germinação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CONCENTRAÇÕES	4	11218,7972	2804,6993	1545,4653 **
TEMPOS DE IMERSÃO	2	733,7866	366,8933	202,1681 NS
CONCENTRAÇÕES X TEMPOS	8	13729,4473	1716,1809	945,6622 NS
(TRATAMENTOS)	14	25682,0311	1834,4308	
RESIDUO	45	81,6657	1,8148	

Apêndice - 3. Resumo da análise de variância para a porcentagem de número de plântulas normais de canjerana em função das combinações de concentrações (0; 2,5; 5; 7,5 e 10% NaOCl) e tempos de imersão (10; 20 e 30 min), avaliados aos 14 dias de cultivo *in vitro* em meio de germinação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CONCENTRAÇÕES	4	364,4869	91,1217	83,0130 **
TEMPOS DE IMERSÃO	2	0,3728	0,1864	0,1698 NS
CONCENTRAÇÕES X TEMPOS	8	1499,0658	187,3832	170,7083 **
(TRATAMENTOS)	14	1863,9256	133,1375	
RESIDUO	45	49,3956	1,0977	

Apêndice - 4. Resumo da análise de variância para altura da planta, de plantas de canjerana, avaliadas em meio nutritivo MS/2 ; MS e WPM aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIOS NUTRITIVOS	2	0,4140	0,2070	60,32 **
RESIDUO	12	0,0412	0,0034	
TOTAL	14	0,4551		

Apêndice - 5. Resumo da análise de variância para número de folhas, de plantas de canjerana, avaliadas em meio nutritivo MS/2 ; MS e WPM aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIOS NUTRITIVOS	2	1,1476	0,5738	55,80 **
RESIDUO	12	0,1234	0,0103	
TOTAL	14	1,2710		

Apêndice - 6. Resumo da análise de variância para número de entrenós, de plantas de canjerana, avaliadas em meio nutritivo MS/2 ; MS e WPM aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIOS NUTRITIVOS	2	0,0531	0,0265	4,80 **
RESIDUO	12	0,0664	0,0055	
TOTAL	14	0,1195		

Apêndice - 7. Resumo da análise de variância para comprimento total das raízes, de plantas de canjerana, avaliadas em meio nutritivo MS/2 ; MS e WPM aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIOS NUTRITIVOS	2	1,2830	0,6415	10,02 **
RESIDUO	12	0,7684	0,0640	
TOTAL	14	2,0514		

Apêndice - 8. Resumo da análise de variância para número de brotos de segmentos oriundos da multiplicação de plantas de canjerana com 60 dias de idade, em função dos tipos de segmento e concentrações de BAP (0 e 2,5 μM) e avaliadas em meio WPM aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPOS DE SEGMENTO	2	0,9319	0,4659	8,0719 **
CONCENTRAÇÕES DE BAP	1	0,0025	0,0025	0,0432 NS
SEGMENTO X BAP	2	0,0383	0,0191	0,3315 NS
(TRATAMENTOS)	5	0,9726	0,1945	
RESIDUO	144	8,3121	0,0577	

Apêndice - 9. Resumo da análise de variância para comprimento de brotos de segmentos oriundos da multiplicação de plantas de canjerana com 60 dias de idade e em função dos tipos de segmento e concentrações de BAP (0 e 2,5 μM) e avaliadas em meio WPM aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPOS DE SEGMENTO	2	0,1012	0,0506	6,4046 **
CONCENTRAÇÕES DE BAP	1	0,0049	0,0049	0,6149 NS
SEGMENTO X BAP	2	0,0109	0,0055	0,6909 NS
(TRATAMENTOS)	5	0,1170	0,0234	
RESIDUO	144	1,1381	0,0079	

Apêndice - 10. Resumo da análise de variância para número de brotos, de segmentos oriundos da multiplicação de plantas de canjerana com 60 dias de idade e avaliadas em meio WPM com 2,5 μM de BAP, KIN E TDZ aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CITOCININAS	3	0,6455	0,2152	60,78 **
RESIDUO	16	0,0566	0,0035	
TOTAL	19	0,7021		

Apêndice - 11. Resumo da análise de variância para comprimento de brotos de segmentos oriundos da multiplicação de plantas de canjerana com 60 dias de idade e avaliadas em meio WPM com 2,5 μM de BAP, KIN e TDZ aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CITOCININAS	3	0,0060	0,0020	0,42 NS
RESIDUO	16	0,0766	0,0048	
TOTAL	19	0,0826		

Apêndice -12. Resumo da análise de variância para o número de brotos de segmentos nodais de canjerana em função de diferentes concentrações (0; 1; 3; 6; 9 e 12 μM de BAP), avaliados aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
DOSES DE BAP	5	0,0383	0,0077	1,36 NS
RESIDUO	24	0,1354	0,056	
TOTAL	29	0,1737		

Apêndice - 13. Resumo da análise de variância para o comprimento de brotos de segmentos nodais de canjerana em função de diferentes concentrações (0; 1; 3; 6; 9 e 12 μM de BAP), avaliados aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
DOSES DE BAP	5	0,0037	0,0007	7,44 **
RESIDUO	24	0,0024	0,0001	
TOTAL	29	0,0060		

Apêndice - 14. Resumo da análise de variância para a sobrevivência de microcepas de canjerana (*Cabralea canjerana*), cultivadas em dois diferentes meios de cultura aos 60 dias de cultivo.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIOS DE CULTURA	1	10,9080	10,9080	12,33 **
RESIDUO	8	7,0795	0,8849	
TOTAL	9	17,9874		

Apêndice - 15. Resumo da análise de variância para o número de microestacas de microcepas de canjerana (*Cabralea canjerana*), cultivadas em dois diferentes meios de cultura aos 60 dias de cultivo.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIOS DE CULTURA	1	0,7630	0,0763	3,13 NS
RESIDUO	8	0,1952	0,0244	
TOTAL	9	0,2715		

Apêndice - 16. Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas cultivadas em 4 diferentes tipos de substratos e oriundas de minicepas de canjerana e avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
SUBSTRATOS	3	9197,9221	3065,9740	49,57 **
RESIDUO	16	989,6208	61,8513	
TOTAL	19	10187,5429		

Apêndice - 17. Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas cultivadas em 4 diferentes tipos de substratos e oriundas de minicepas de canjerana e avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
SUBSTRATOS	3	6276,0309	2092,0103	11,60 **
RESIDUO	16	2884,3968	180,2748	
TOTAL	19	9160,4278		

Apêndice - 18. Resumo da análise de variância para número de raízes de miniestacas cultivadas em 4 diferentes tipos de substratos e oriundas de minicepas de canjerana e avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
SUBSTRATOS	3	0,0101	0,0034	0,06 NS
RESIDUO	16	0,8873	0,0554	
TOTAL	19	0,8974		

Apêndice - 19. Resumo da análise de variância para comprimento de raízes de miniestacas cultivadas em 4 diferentes tipos de substratos e oriundas de minicepas de canjerana e avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
SUBSTRATOS	3	0,1436	0,0479	1,61 NS
RESIDUO	16	0,4763	0,0298	
TOTAL	19	0,6199		

Apêndice - 20. Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas oriundas de minicepas de canjerana em função dos tipos de segmento (apical e nodal) e concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 3000 mg L⁻¹), avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPOS DE SEGMENTO	1	48,0438	48,0438	0,1634 NS
CONCENTRAÇÕES DE AIB	3	1152,4527	384,1509	1,3062 NS
SEGMENTO X AIB	3	59,3621	19,7874	0,0673 NS
(TRATAMENTOS)	7	1259,8587	179,9798	
RESIDUO	32	9411,4954	294,1092	

Apêndice - 21. Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas oriundas de minicepas de canjerana em função dos tipos de segmento (apical e nodal) e concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 3000 mg L⁻¹), avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPOS DE SEGMENTO	1	1063,4479	1063,4479	5,3069 **
CONCENTRAÇÕES DE AIB	3	7754,5519	2584,8506	12,8990 **
SEGMENTO X AIB	3	894,2362	298,0787	1,4875 NS
(TRATAMENTOS)	7	9712,2360	1387,4623	
RESIDUO	32	6412,5266	200,3915	

Apêndice - 22. Resumo da análise de variância para número de raízes de miniestacas oriundas de minicepas de canjerana em função dos tipos de segmento (apical e nodal) e concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 3000 mg L⁻¹), avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPOS DE SEGMENTO	1	0,2939	0,2939	4,4965 **
CONCENTRAÇÕES DE AIB	3	2,9016	0,9672	14,7987 **
SEGMENTO X AIB	3	0,3570	0,1190	1,8203 NS
(TRATAMENTOS)	7	3,22	0,4600	
RESIDUO	32	2,0928	0,0654	

Apêndice - 23. Resumo da análise de variância para comprimento de raízes de miniestacas oriundas de minicepas de canjerana e em função dos tipos de segmento e concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 3000 mg L⁻¹), avaliadas aos 60 dias de cultivo em câmara de nebulização.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPOS DE SEGMENTO	1	1,8032	1,8032	36,6504 **
CONCENTRAÇÕES DE AIB	3	10,3398	3,4466	70,0528 **
SEGMENTO X AIB	3	0,1184	0,0372	0,7560 NS
(TRATAMENTOS)	7	13,1194	1,8742	
RESIDUO	32	1,5744	0,0492	

Apêndice - 24. Resumo da análise de variância para número de miniestacas oriundas da primeira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	0.0480	0.0240	0.55 NS
RESIDUO	21	0.9147	0.0436	
TOTAL	23	0.9627		

Apêndice - 25. Resumo da análise de variância para número de miniestacas oriundas da segunda coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	0.0525	0.0262	0.68 NS
RESIDUO	21	0.8131	0.0387	
TOTAL	23	0.8656		

Apêndice - 26. Resumo da análise de variância para número de miniestacas oriundas da terceira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	0.0509	0.0254	0.70 NS
RESIDUO	21	0.7635	0.0364	
TOTAL	23	0.8143		

Apêndice - 27. Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas oriundas da primeira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	1012.6641	506.3321	65.85 **
RESIDUO	21	161.4779	7.6894	
TOTAL	23	1174.1421		

Apêndice - 28. Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas oriundas da segunda coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	682.9927	341.4964	67.44 **
RESIDUO	21	106.3435	5.0640	
TOTAL	23	789.3362		

Apêndice - 29. Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de miniestacas oriundas da terceira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	1671.8285	835.9142	289.99 **
RESIDUO	21	60.5329	2.8825	
TOTAL	23	1732.3613		

Apêndice - 30. Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas oriundas da primeira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	485.2836	242.6418	60.26 **
RESIDUO	21	84.5614	4.0267	
TOTAL	23	569.8450		

Apêndice - 31. Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas oriundas da segunda coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	657.4051	328.7025	60.14 **
RESIDUO	21	114.7847	5.4659	
TOTAL	23	772.1898		

Apêndice - 32. Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento de miniestacas oriundas da terceira coleta de minicepas de canjerana cultivadas em casa de vegetação e em minijardim com sistema de fertirrigação fechada.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	589.1859	294.5930	39.50 **
RESIDUO	21	156.6355	7.4588	
TOTAL	23	745.8215		

ANEXOS

Anexo A - Solução nutritiva original utilizada em estudo de produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hill.). WENDLING et al. (2007).

FERTILIZANTES	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)
Nitrogênio	69,90
Fósforo	16,28
Potássio	170,68
Cálcio	161,40
Magnésio	33,70
Enxofre	79,65
Boro	0,50
Cobre	0,50
Ferro	5,0
Magnésio	1,0
Zinco	0,20
Molibdênio	0,07

Anexo B - Solução de micronutrientes para erva-mate, louro-pardo e canjerana.

Nutrientes	(mg L ⁻¹)	% do nutriente no fertilizante	Nutriente (mg L ⁻¹)	Nutrientes para 1 litro de solução
Ácido Bórico	0,5	17,5	2,86	5,72
Sulfato de Cobre	0,5	25,5	1,96	3,92
Sulfato de Manganês	1,0	24,6	4,06	8,13
Sulfato de Zinco	0,2	22,7	0,88	1,76
Molibdato de Sódio	0,07	39,0	0,18	0,36

Anexo C - Solução nutritiva para erva-mate, louro-pardo e canjerana.

Ordem de Mistura da Solução	100% para 50 litros	75% para 50 litros	50% para 50 litros	25% para 50 litros
1. KNO ₃	40,44 g	30,33 g	15,16 g	7,50 g
2. MgSO ₄	34,10 g	25,57 g	12,78 g	6,39 g
3. NH ₄ NO ₃	12,00 g	9,00 g	4,50 g	2,25 g
4. KH ₂ PO ₄	6,81 g	5,10 g	2,55 g	1,27 g
5. Calcinit	46,30 g	34,72 g	17,36 g	8,68 g
6. Micronutrientes	10 mL	7,50 mL	3,75 mL	1,87 mL
7. Ferro	1,0 g	0,75 g	0,37 g	0,19 g

Observações: Para o preparo da solução nutritiva, os nutrientes devem ser dissolvidos separadamente em água sem que haja precipitação. Adicione os nutrientes na ordem em que se encontram na tabela, misturando bem, cada vez que se adiciona um dos nutrientes.