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

Kelen Haygert Lencina

MICROPROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J. F. MACBRIDE

Santa Maria, RS
2016

Kelen Haygert Lencina

MICROPROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J. F. MACBRIDE

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Florestal**

Orientador: Prof. Dilson Antônio Bisognin, PhD.

Santa Maria, RS
2016

Kelen Haygert Lencina

MICROPROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Apuleia leiocarpa* **(VOGEL) J. F. MACBRIDE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Florestal**

Aprovado em 05 de maio de 2016:

_____
Dilson Antônio Bisognin, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

_____
Fernando Teixeira Nicoloso, PhD. (UFSM)

_____
Leonardo Ferreira Dutra, Dr. (EMBRAPA)

_____
Marcelo Teixeira Pacheco, PhD. (UFRGS)

_____
Rejane Flores, Dra. (IFFarroupilha/SVS)

Santa Maria, RS
2016

À Rozangela e Guilherme Martin

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, por meio do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela contribuição a minha formação acadêmica, e à CAPES, pelo fornecimento do apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Professor Dilson Antônio Bisognin pela orientação, pela confiança em meu trabalho e pela dedicação com as pesquisas desenvolvidas no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (MPVP). Sou grata por todos os ensinamentos, nunca poupados.

Ao Professor Frederico Dimas Fleig – coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal pela co-orientação deste trabalho e disposição.

À Professora Rejane Flores por fazer parte da minha trajetória e sempre estar presente.

Ao professor Fernando Teixeira Nicoloso, ao pesquisador Leonardo Ferreira Dutra e ao professor Marcelo Teixeira Pacheco pela disponibilidade para contribuir com este trabalho.

A Maninha (Marlene Machado) por todo o carinho e amizade.

Ao Jorge Diefenthaeler, Clândio A. Marchi Rosa, Gerson Selle e em especial ao Roberto F. Pinheiro Machado e minha querida Naira Segatto, pela amizade e energias positivas.

Às minhas companheiras de trajetória Paula Kielse e Nathalia Pimentel, pela dedicação e amizade.

À meus amigos e colegas do MPVP que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade, apoio e ajuda para a realização deste trabalho gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Ao Eneas Ricardo Konzen por me receber e me proporcionar a obtenção dos dados do último capítulo, e acima de tudo pela amizade de tantos anos. Também a professora Tsai Siu Mui por me receber em seu laboratório.

Aos queridos colegas Thomas Schröder e Rafael Callegaro pela ajuda na coleta das amostras, podem contar comigo sempre.

À minha amiga Suelen Carpenedo Aimi por ter sido minha parceira de jornada e ter deixado tudo mais fácil.

Às amigas que fazem parte da minha vida há tanto tempo, Renata Schlesner, Verônica Tironi Dias e Rosana Tironi Dias, por todos os anos de amizade e por todos os momentos compartilhados.

Agradecimentos a Janaina Rocha, Gisele Gomez, Catarine Consensa, e Jardel Boscardin, Elis Deon e Jéssica Goulart pela valorosa amizade.

Por fim, e mais importante, agradeço à Rozangela, Decio, Guilherme Martin, Tarcisio, Miqueli, Thais, Eduarda, Rafael e Alex. Vocês são o melhor da minha vida, minhas fortalezas, meus pilares, minha fonte de carinho.

RESUMO

MICROPROPAGAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J. F. MACBRIDE

AUTORA: KELEN HAYGERT LENCINA
ORIENTADOR: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a produtividade de microcepas mantidas *in vitro*, o enraizamento e a aclimatização de plantas micropropagadas, assim como avaliar a diversidade genética em *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride (grápia) com uso de marcadores RAPD. Microcepas oriundas da poda drástica de plantas assépticas foram cultivadas em meio de cultura WPM acrescido de 0, 2,2, 4,4, 6,6 e 8,8 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e subcultivadas em meio de cultura WPM sem citocinina. Microcepas também foram cultivadas em meio de cultura WPM, MS ou ½ MS, acrescido ou não de 1,5 g L^{-1} de carvão ativado e submetidas a três coletas de brotos aos 30, 60 e 90 dias de cultivo. No enraizamento *in vitro*, segmentos nodais e microestacas foram mantidos em meio de cultura WPM com 0, 4,9, 9,8, 14,7 e 19,6 µM de ácido indolbutírico (AIB). Na aclimatização das plantas foram testadas as composições de substrato comercial + vermiculita + areia grossa e substrato comercial + vermiculita, em iguais proporções. Para o enraizamento *ex vitro*, segmentos nodais e microestacas foram tratados ou não com 4920 µM de AIB por 10 segundos e cultivados em iguais proporções de substrato comercial + vermiculita + areia grossa, substrato comercial + vermiculita e substrato comercial + areia grossa. Para as análises RAPD, o DNA foi extraído de amostras foliares de 88 plantas. Foram avaliados 18 iniciadores, sendo a visualização dos fragmentos realizada em gel de agarose preparado a 1,2% (p/v), contendo 3 µL de brometo de etídio e submetido a eletroforese. Os fragmentos foram pontuados com ausência ou presença gerando uma matriz binária. Foi calculada a contribuição relativa de cada iniciador para o polimorfismo bem como o polimorfismo total. Também foi calculado o conteúdo de informação para o polimorfismo (PIC) para cada fragmento e por iniciador. A análise de agrupamento foi realizada com base na similaridade de Jaccard e no método UPGMA. A manutenção das microcepas de grápia em meio de cultura WPM ou ½ MS suplementado com 8,8 µM de BAP, seguido do subcultivo em meio de cultura sem citocinina aumenta o número e comprimento das brotações. O cultivo de microcepas em meio de cultura com carvão ativado aumenta a produção de microestacas por microcepas, enquanto a ausência de carvão ativado favorece a formação de calos e brotos por organogênese indireta. Quanto ao enraizamento *in vitro*, os segmentos nodais apresentaram maior resposta do que microestacas, sendo necessária a suplementação do meio de cultura com AIB. A composição do substrato não afetou a sobrevivência e o crescimento das plantas produzidas *in vitro* durante a aclimatização. As melhores respostas de enraizamento *ex vitro* foram obtidas com segmentos nodais, assim como com explantes tratados com 4920 µM de AIB e cultivados em substrato comercial + vermiculita + areia grossa. Tanto a manutenção *in vitro* de microcepas quanto o enraizamento *ex vitro* são técnicas promissoras para a produção de plantas de grápia. O marcador RAPD é eficiente para a análise genética e detectou alta variabilidade genética na grápia.

Palavras-chave: Microcepas. Microestaca. Segmento nodal. Enraizamento *ex vitro*. RAPD.

ABSTRACT

MICROPROPAGATION AND GENETIC DIVERSITY OF *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J. F. MACBRIDE

AUTHOR: KELEN HAYGERT LENCINA
ADVISER: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* productivity of micro-stumps, *in vitro* and *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated plantlets, and to assess the genetic diversity of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride (apuleia) with RAPD markers. Micro-stumps originated from drastic pruning of aseptic seedlings were grown in WPM culture medium supplemented with 0; 2.2; 4.4; 6.6 and 8.8 µM of 6-benzylaminopurine (BAP) and sub-cultured in WPM medium without cytokinin. Apuleia micro-stumps were also grown in WPM, MS or ½ MS, with or without 1.5 g L^{-1} of activated charcoal. Three shoot collections were done at 30, 60 and 90 days of cultivation. Nodal segments and micro-cuttings were maintained in WPM culture medium with 0; 4.9; 9.8; 14.7 and 19.6 µM of indole butyric acid (IBA). For acclimatization, rotted nodal segments and micro-cuttings were planted in equal proportions of commercial substrate + vermiculite + coarse sand, and commercial substrate + vermiculite. For *ex vitro* rooting, nodal segments and micro-cuttings were treated or not with 4920 µM of IBA for 10 seconds and cultivated in equal proportions of commercial substrate + vermiculite + coarse sand, commercial substrate + vermiculite, and commercial substrate + coarse sand. For genetic analysis, DNA was extracted from leaf samples of 88 plants of apuleia. Eighteen RAPD primers were tested. The amplified fragments were separated in agarose gel of 1.2% (v/v), containing 3 µL of ethidium bromide. The fragments were marked as absence or presence, generating a binary matrix. Total polymorphism and the relative contribution of each primer for the polymorphism were calculated. The polymorphism information content (PIC) was calculated for each fragment and primer. Cluster analysis was based upon Jaccard similarity and UPGMA method. The conservation of the apuleia micro-stumps in WPM or ½ MS media supplemented with 8.8 µM of BAP and sub-cultured in culture medium without citokynin increases number and length of shoots. Maintaining micro-stumps in culture medium supplemented with activated charcoal increases micro-cuttings production, but in its absence results in callus formation and indirect organogenesis of shoots. Nodal segments were more competent than micro-cuttings for rooting in culture medium without IBA. Substrate composition does not affect survival and growth during acclimatization of *in vitro* produced plantlets. Nodal segments treated with 4920 µM of IBA and cultivated in commercial substrate + vermiculite + coarse sand show the best responses for *ex vitro* rooting. Both *in vitro* conservation of apuleia micro-stumps and *ex vitro* rooting are promising strategies for plantlet production. The RAPD is a feasible technique for genetic analysis, and it identifies high genetic variability in apuleia.

Key-words: Micro-stumps. Nodal segment. Micro-cutting. *Ex vitro* rooting. RAPD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da grápia (*Apuelia leiocarpa*) no Brasil. 19
Figura 2 - Estádios sucessivos da germinação de *Apuleia leiocarpa*, plântula e muda. A – Emissão da radícula; B, C e D – 3°, 4° e 5° dia após a semeadura, respectivamente; E – Perda do tegumento; F - Abertura dos cotilédones entre o 5º e 7º dia de semeadura; G e H – Plântula; I – Muda (c – cotilédone; cf – coifa; co – colo; ep – epicótilo; f – folha; fo – folíolo; hp – hipocótilo; n – nervuras; pro – protófilo; r – radícula; rp – raiz primária; rs – raiz secundária; rt – raiz terciária; t - tegumento). Barra: 4 cm para A a H e 5 cm para I. 21
Figura 3 - Etapas para a formação de microcepas e para o preparo de microestacas de grápia (A), microcepa com formação de calo na raiz (B) e organogênese no calo da microcepas (C). 36
Figura 4 – Etapas para a obtenção dos segmentos nodais e das microestacas utilizados no enraizamento de grápia. 54
Figura 5 – Plantas micropropagadas de grápia após 30 dias de aclimatização em duas composições de substrato. Substrato comercial (SC) + vermiculita (V) + areia grossa (A) e substrato comercial + vermiculita (B). 60
Figura 6 – Amostras de DNA genômico de grápia (*Apuleia leiocarpa*) visualizadas em gel de agarose à 1,0% de concentração. 74
Figura 7 – Gel de agarose a 1,2% com 88 genótipos de *Apuleia leiocarpa* amplificados com o iniciador RAPD 13. A extremidade esquerda contém marcador de 100pb (M). P = plantas matrizes adultas e as demais mudas de três anos de idade. 75
Figura 8 – Valores de conteúdo de informação para o polimorfismo (PIC) por fragmento dos 18 iniciadores RAPD utilizados para a análise genética de *Apuleia leiocarpa*. 79
Figura 9 – Valores de correlações (r) e estresse (E) entre matrizes de similaridade obtidas para diferentes números de fragmentos polimórficos utilizados para a análise genética de *Apuleia leiocarpa*. 81
Figura 10 – Dendrograma por agrupamento UPGMA obtido a partir da matriz de distância genética baseada no índice de Jaccard representando a dissimilaridade genética entre os genótipos grápia. P = plantas matrizes adultas e as demais mudas de três anos de idade. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de sobrevivência (S%) e brotação (B%) das microcepas, número de brotos (NB), comprimento dos brotos (CB), número de microestacas por broto (MB) e por microcepa (MM) de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina. 38

Tabela 2 - Porcentagem de sobrevivência (S%) e brotação (B%) das microcepas, número de brotos (NB), comprimento dos brotos (CB), número de microestacas por broto (MB) e por microcepas (MM) de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura com 8,8 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP) e suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas. 40

Tabela 3 - Porcentagem de calo (C%), de calos com a formação de brotações por morfogênese indireta (CBR%) e de oxidação (O%) em microcepa de grápia mantidas em diferentes meios de cultura com 8,8 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP) e suplementados ou não com carvão ativado (g/L^{-1}) e avaliados durante três coletas sucessivas. 44

Tabela 4 - Porcentagem de sobrevivência e de enraizamento *in vitro*, número e comprimento das raízes formadas em segmentos nodais e microestacas de grápia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB). 58

Tabela 5 – Porcentagem de sobrevivência, altura da parte aérea (cm) e número de folhas em plantas de grápia enraizadas *in vitro* e aclimatizadas por 30 dias em sala de crescimento. 59

Tabela 6 – Porcentagem de sobrevivência e enraizamento *ex vitro*, número e comprimento das raízes formadas em de segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida. 62

Tabela 7 - Características físicas da composição dos substratos utilizados para aclimatização das plantas micropropagadas e enraizamento *ex vitro* de explantes de grápia. 63

Tabela 8 – Identificação dos iniciadores RAPD analisados com suas respectivas sequências de bases, número de fragmentos amplificados e polimórficos, contribuição relativa para o polimorfismo por iniciador (%) e polimorfismo total obtidos da amplificação de DNA genômico de *Apuleia leiocarpa*. 76

Tabela 9 – Frequências fragmentos e valores de conteúdo de informação para o polimorfismo (PIC) para os 18 iniciadores RAPD utilizados para a análise genética de *Apuleia leiocarpa*. 78

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 - Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência das microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina. 101

Apêndice 2 - Resumo da análise de variância para porcentagem de brotação das microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina. 101

Apêndice 3 – Resumo da análise de variância para número de brotos formados microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina. 101

Apêndice 4 – Resumo da análise de variância para o comprimento dos brotos formados microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina. 101

Apêndice 5 – Resumo da análise de variância para número de microestacas por broto formado nas microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina. 102

Apêndice 6 – Resumo da análise de variância para número de microestacas por microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina. 102

Apêndice 7 – Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas. 102

Apêndice 8 – Resumo da análise de variância para brotação das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas. 102

Apêndice 9 - Resumo da análise de variância para número de brotos das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas. 103

Apêndice 10 - Resumo da análise de variância para comprimento dos brotos das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas. 103

Apêndice 11 - Resumo da análise de variância para número de microestacas por broto das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas. 103

Apêndice 12 - Resumo da análise de variância para número de microestacas por microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas. 104

Apêndice 13 - Resumo da análise de variância para porcentagem de calo em microcepa de grápia mantidas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados durante em três coletas. 104
Apêndice 14 - Resumo da análise de variância para calos com a formação de brotações por organogênese indireta em microcepa de grápia mantidas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados durante em três coletas. 104
Apêndice 15 - Resumo da análise de variância para porcentagem de oxidação em microcepa de grápia mantidas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados durante em três coletas. 105
Apêndice 16 – Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de segmentos nodais e microestacas de apuleia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB). 105
Apêndice 17 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento de segmentos nodais e microestacas de apuleia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB). 105
Apêndice 18 – Resumo da análise de variância para o número raízes formadas em segmentos nodais e microestacas de grápia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB). 106
Apêndice 19 – Resumo da análise de variância para o comprimento das raízes (cm) formadas em segmentos nodais e microestacas de apuleia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB). 106
Apêndice 20 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência de plantas de grápia enraizadas *in vitro* e aclimatizadas por 30 dias em sala de crescimento. 106
Apêndice 21 – Resumo da análise de variância para o altura da parte aérea (cm) de plantas de grápia enraizadas *in vitro* e aclimatizadas por 30 dias em sala de crescimento. 106
Apêndice 22 – Resumo da análise de variância para o número de folhas em plantas de grápia enraizadas *in vitro* e aclimatizadas por 30 dias em sala de crescimento. 106
Apêndice 23 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência de segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida. 107
Apêndice 24 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento de segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida. 107
Apêndice 25 – Resumo da análise de variância para o número de raízes formadas em segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida. 107
Apêndice 26 – Resumo da análise de variância para o comprimento de raízes formadas em segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida. 108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-iP	2- isopentenil adenina
AFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados - *Amplified Fragment Length Polymorphism* -
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
BAP	6-benzilaminopurina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônia
IAA	Ácido 4-cloro indolacético
KIN	Cinetina
MS	Murashige e Skoog
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVP	Polivinilpirrolidone
RAPD	Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso - *Random Amplified Polymorphic DNA* -
RFLPs	Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição - *Restriction Fragment Length Polymorphism* -
STR	Repetições curtas em série - *Short Tandem Repeats* -
WPM	Wood Plant Medium
ZEA	Zeatina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 OBJETIVO GERAL 16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE 18
2.2 MICROPROPAGAÇÃO 22
2.3 VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES 27
3 CAPITULO I 31
3.1 INTRODUÇÃO 32
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 34
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
3.4 CONCLUSÕES 45
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46
4 CAPITULO II 50
4.1 INTRODUÇÃO 51
4.2 MATERIAL E MÉTODOS 53
4.2.1 Enraizamento *in vitro* e aclimatização 55
4.2.2 Enraizamento *ex vitro* e aclimatização 56
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 56
4.3.1 Enraizamento *in vitro* e aclimatização 56
4.3.2 Enraizamento *ex vitro* e aclimatização 60
4.4 CONCLUSÃO 64
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64
5 CAPITULO III 67
5.1 INTRODUÇÃO 68
5.2 MATERIAL E MÉTODOS 71
5.2.1 Extração do DNA 71
5.2.2 Reações de amplificação PRC-RAPD 71
5.2.3 Polimorfismo dos marcadores RAPD 72
5.2.4 Número adequado de marcadores RAPD para análise genética 73
5.2.5 Distância genética entre os genótipos de grápia 73
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 74
5.3.1 Extração de DNA 74
5.3.2 Reações de amplificação PCR-RAPD 74
5.3.3 Polimorfismo dos marcadores RAPD **75**
5.2.4 Número adequado de marcadores RAPD para análise genética **79**
5.3.5 Distância genética entre os genótipos de grápia **82**
5.4 CONCLUSÃO 84
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas em tecnologia para produção de sementes e mudas de espécies arbóreas exóticas possuem destaque no Brasil e têm possibilitado significativos avanços genéticos e aumento da produtividade em povoamentos comerciais (SCREMIN-DIAS et al., 2006). Para o eucalipto, estima-se que 85% das mudas são produzidas por propagação vegetativa (SILVA et al., 2008), permitindo a obtenção de plantas uniformes, além de possibilitar a fixação de características favoráveis, pelo resgate e multiplicação de indivíduos selecionados em qualquer fase do programa de melhoramento genético (BISOGNIN, 2011; FERRARI et al., 2004; BORÉM; MIRANDA, 2013). Outra vantagem da propagação vegetativa é a possibilidade de multiplicação de indivíduos que apresentam dificuldade de propagação por sementes, o que comumente pode ser observado em espécies arbóreas nativas.

O setor produtivo de mudas de árvores nativas se encontra com atraso tecnológico de quase quatro décadas, ocasionado pela produção de mudas com baixa qualidade genética, além do restrito conhecimento acerca do processo produtivo (SCREMIN-DIAS et al., 2006). Entretanto, apesar do uso da propagação vegetativa ser relativamente recente na multiplicação de espécies nativas, essa tecnologia pode contornar problemas de propagação e disponibilizar mudas que dificilmente seriam encontradas no mercado.

A propagação vegetativa de eucalipto é realizada predominantemente por miniestaquia, que se constitui de uma técnica capaz de reduzir o tempo e o custo final de produção (SILVA et al., 2008). O grau de eficiência que a miniestaquia apresenta nos dias atuais, considerando a viabilidade técnica e econômica da produção massal de mudas de eucalipto, se baseia no detalhado estudo da micropropagação e da microestaquia. Para as espécies nativas, a propagação vegetativa por micropropagação, microestaquia e miniestaquia têm se mostrado promissora para a produção de mudas (AFFONSO, 2011; BEZERRA et al., 2014; HORBACH et al., 2011), mas diversas espécies ainda não possuem um eficiente protocolo de multiplicação utilizando essas técnicas.

A micropropagação permite a propagação de genótipos de difícil enraizamento, a limpeza clonal e a multiplicação de plantas em larga escala e curto espaço de tempo, aliada à possibilidade de utilização na conservação de germoplasma *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2013; WENDLING et al., 2006; XAVIER et al., 2013). Na microestaquia, plantas micropropagadas são submetidas à poda drástica para formar as microcepas, as quais são fonte dos brotos que

são seccionados para a obtenção das microestacas utilizadas no enraizamento (ASSIS et al., 1992; ASSIS, 1996). Estudos apontam que as microcepas podem ser mantidas *in vitro* para constante coleta de material vegetativo, possibilitando maior aproveitamento dos propágulos e aumento da taxa de multiplicação. Para louro-pardo [*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel], a manutenção *in vitro* de microcepas mostrou-se um método promissor para a multiplicação dessa espécie (FICK, 2007; HEBERLE, 2010), sendo o mesmo observado para erva-mate [*Ilexparaguariensis*(Saint) Hilaire] (HORBACH, 2008). Para a grápia [*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride] também foi avaliada a manutenção *in vitro* de microcepas (LENCINA, 2013).

A grápia é uma espécie arbórea, nativa do Brasil, que possui madeira de elevada qualidade, mas que é dificilmente encontrada no mercado de sementes e/ou mudas. A obtenção de sementes tem sido prejudicada, entre outros fatores, pela redução dos remanescentes naturais, em razão do corte seletivo dos indivíduos em busca da madeira, e pela irregularidade de produção de sementes ao longo dos anos. Além disso, as sementes de grápia possuem dormência tegumentar, o que dificulta o processo de germinação caso não seja realizado tratamento para a quebra de dormência (CARVALHO, 2003).

A grápia deve ser considerada como uma das mais valiosas espécies da Floresta Estacional Decidual, pois apresenta aspecto fisionômico que caracteriza a classificação dessa tipologia florestal (KLEIN, 1972). Atualmente, essa espécie é considerada ameaçada de extinção pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA, 2012) e pelo Decreto Estadual nº 52.109, de 1º de dezembro de 2014. Brancalion et al. (2009), mencionam que plantios de restauração florestal raramente incluem espécies ameaçadas de extinção, especialmente pela dificuldade de obtenção de sementes e mudas desses indivíduos.

Considerando o elevado valor comercial da madeira de grápia, além do fato de ser espécie ameaçada de extinção e a dificuldade de produção de sementes e mudas, ações que envolvam a multiplicação dessa espécie via propagação vegetativa e o conhecimento dos níveis de variabilidade genética são imprescindíveis para delinear estratégias que visem à conservação, o manejo sustentado e o melhoramento genético dessa espécie.

Para a grápia, Lencina (2013) realizou o estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas, possibilitando a obtenção de propágulos livres de contaminantes e com características juvenis, os quais podem ser empregados na multiplicação e enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dessa espécie. Além disso, foram realizados estudos preliminares relacionados

à manutenção *in vitro* de microcepas, sugerindo a necessidade de pesquisas que envolvam aspectos relacionados às condições de cultivo das microcepas, avaliações da taxa de multiplicação em sucessivos subcultivos e competência dos explantes para a formação de raízes adventícias (LENCINA, 2013). Tais aspectos são o foco principal da presente pesquisa, a qual busca ampliar as informações referentes às metodologias para produção continuada de propágulos em microcepas mantidas *in vitro*, para posterior enraizamento adventício.

Este estudo também considerou que a caracterização da diversidade genética, principalmente em populações naturais de espécies potencialmente ameaçadas de extinção, reflete com eficiência o potencial de manutenção da variação e adaptabilidade dessas populações. No caso da grápia, dados de diversidade genética obtidos por marcadores isoenzimáticos, associados com análise da paisagem foram utilizados para indicar estratégias e áreas efetivas de conservação da espécie (STEINER, 2014). Entretanto, não há informações até o presente momento de estudos com marcadores de DNA.

Nesse contexto, a perspectiva desta pesquisa foi complementar os estudos anteriormente desenvolvidos com a grápia, reiterando a utilização de microcepas estabelecidas e mantidas *in vitro* para fornecimento de brotos, além do posterior enraizamento desses propágulos e aclimatização das plantas micropropagadas. Além disso, este trabalho visa contribuir com informações sobre tecnologias de produção de mudas por propagação vegetativa de espécies florestais nativas.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a multiplicação *in vitro*, o enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, bem como realizar estudos sobre a diversidade genética em grápia com marcadores RAPD.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de utilização de microcepas para a manutenção e multiplicação *in vitro* de genótipos de grápia.
- Avaliar o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* e a aclimatização de plantas.

- Analisar a variabilidade genética e selecionar iniciadores RAPD para o estudo da diversidade genética em grápia.
- Identificar fragmentos com potencial para o sequenciamento de regiões conservadas do genoma da grápia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

Pertencente à família Fabaceae, a *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride (grápia) é uma espécie arbórea da Mata Atlântica e considerada a rainha das florestas nos estados sulinos. A grápia ocorre naturalmente desde o Peru (MENDONÇA FILHO, 1996) até o Uruguai (SOBRAL, 2006). No Brasil, essa espécie ocorre do Nordeste (RIZZINI, 1971) até o Rio Grande do Sul (Figura 1), onde está presente no estrato emergente da Floresta Estacional Decidual, especialmente no Vale do Alto Uruguai e na bacia do rio Jacuí, até a formação Baixo-Montana (KLEIN, 1984; TABARELLI, 1992; VACCARO et al., 1999).

A espécie apresenta duas variedades: *A. leiocarpa* var. *leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride. e *A. leiocarpa* var. *mollaris* (Spreng.) Toepen (RIZZINI, 1971; GUNN, 1991). A classificação leva em consideração as características morfológicas de seus frutos e sementes, que além da distribuição geográfica, as classificariam como duas espécies distintas, sendo *Apuleia leiocarpa*, de ocorrência nos estados do Sul do Brasil, enquanto *Apuleia mollaris* apresenta dispersão mais ampla, sendo o Estado do Paraná o limite entre as duas espécies (HERINGER; FERREIRA, 1973).

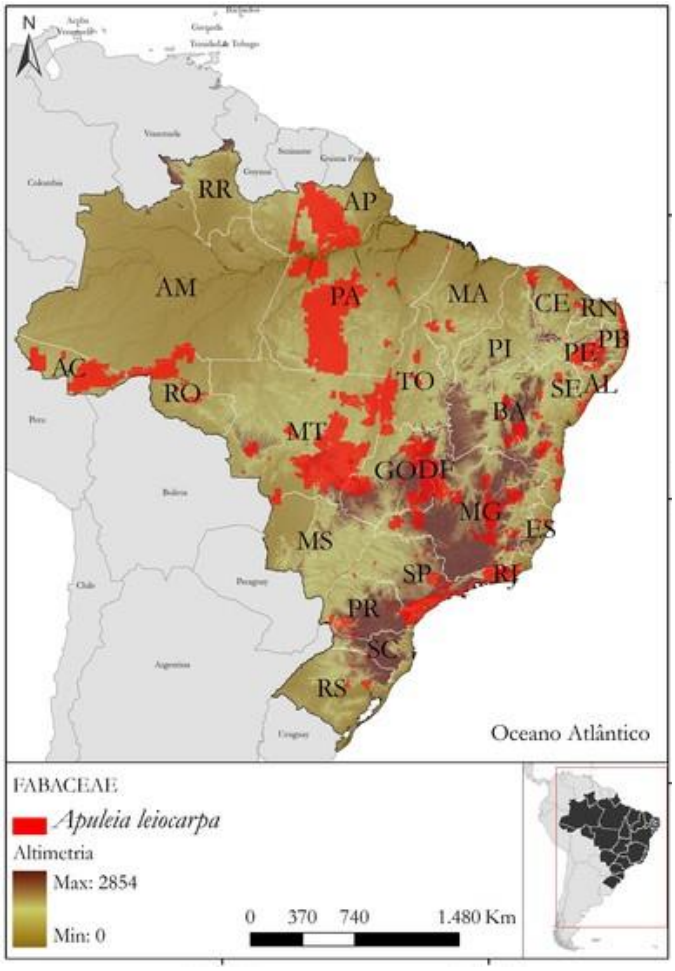
A grápia é uma espécie diploide, com número normal de cromossomos em *A. leiocarpa* igual a 2n = 2x = 26. Foi observada variação no número de cromossomos de 20 a 28, indicando que essa espécie possivelmente apresenta a capacidade de polissomatia. Além disso, os cromossomos são relativamente pequenos e a fórmula cariotípica é composta por 20 metacêntricos + 4 submetacêntricos + 2 telocêntricos (20m + 4 sm + 2t) (AULER; BATTISTIN, 1999).

É reconhecida pelo potencial apícola, paisagístico e principalmente florestal, por fornecer madeira de elevada qualidade, indicada para construção de estruturas externas, construção civil, marcenaria, energia, celulose, entre outros fins. Na Região de Bento Gonçalves (RS), a madeira dessa espécie é preferida para a confecção de tonéis para envelhecimento de vinhos (CARVALHO, 2003). Além disso, a grápia tem potencial medicinal, sendo recentemente estudada a atividade antimicrobiana da proteína lectina ApulSL, extraída das sementes (CARVALHO et al., 2015). Também, o extrato dos frutos foi avaliado quanto à atividade biocida o qual apresenta limitada citotoxicidade *in vitro* e alto

potencial como fonte de protótipos no desenvolvimento de drogas antibiofilme (SILVA et al., 2014).

Quanto ao aspecto fitossociológico, a grápia é classificada como secundária tardia, segundo estudo realizado no Rio Grande do Sul (VACCARO et al., 1999). Espécies desse estágio sucessional apresentam características similares às pioneiras, no entanto, mais tolerantes ao sombreamento, apesar de não se desenvolverem sob o dossel da floresta (TABARELLI, 1992). Pode ser plantada em povoamento misto a pleno sol, associada com espécies pioneiras, ou no enriquecimento em linhas de florestas secundárias (MAIXNER; FERREIRA, 1976; LELES et al., 2000).

Figura 1 – Distribuição da grápia (*Apuelia leiocarpa*) no Brasil.



Fonte: Centro Nacional de Conservação da Flora (2012). Disponível em: http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Apuleia%20leiocarpa.

A grápia é uma árvore caducifólia, que na região Sul atinge altura de até 35 metros e 100 cm de diâmetro à altura do peito (DAP). A copa é larga, bem ramificada e pouco densa (KLEIN, 1982), o tronco é irregular a cilíndrico, com casca apresentando escamas delgadas, que desprendem facilmente em placas rígidas na forma de concha, deixando cicatrizes que a torna inconfundível na floresta (CARVALHO, 2003).

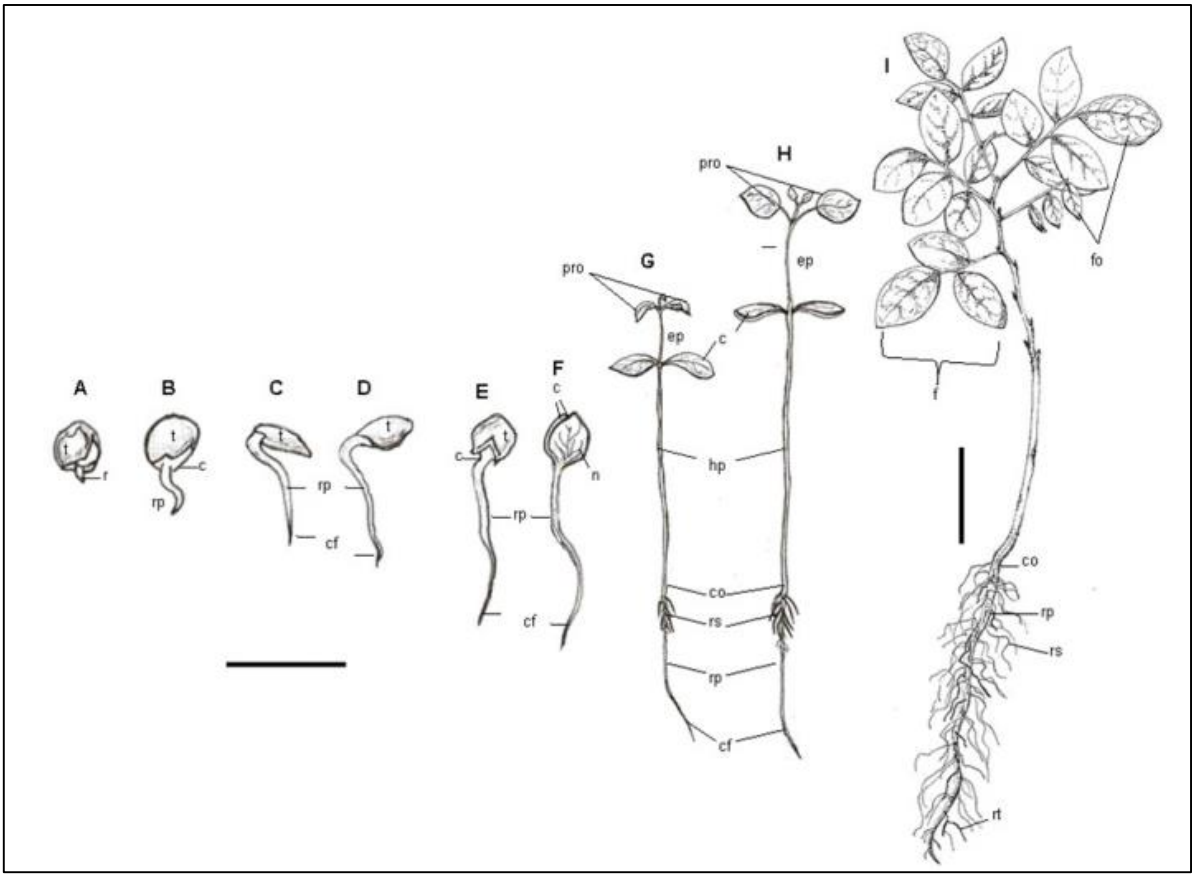
Em estudo realizado em cobertura florestal pertencente ao domínio da Floresta Estacional Decidual na região norte do Rio Grande do Sul, a floração ocorre durante a transição para o período de maior pluviosidade na região (FILIPPI et al., 2012). A ocorrência de flores foi caracterizada como anual e possivelmente explosiva, de curta duração, com a presença de botões florais e logo após, frutos (FILIPPI et al., 2012; PEREIRA et al., 2008). Planta monóica, com flores hermafroditas ou masculinas (BACKES; IRGANG, 2004), provavelmente alógama (SAMPAIO; VENTURIERI, 1990) e polinizada especialmente por abelhas. A floração ocorre, geralmente, de agosto a outubro no Rio Grande do Sul. Os frutos amadurecem de novembro a abril e os frutos são dispersos pelo vento (CARVALHO, 2003).

A grápia apresenta irregularidade na produção de sementes, levando dois ou mais anos para se obter uma safra satisfatória (MATTOS; GUARANHA, 1983). Informação que foi corroborada por Filippi et al. (2012), que também verificou diferença na produção de frutos e sementes, conforme o ano e a planta matriz. Além disso, as sementes apresentam dificuldade de germinação, em decorrência da presença de tegumento duro e impermeável à água, característica comum em espécies leguminosas (LORENZI, 2002; NICOLOSO et al., 1997). Sementes que desenvolvem tegumentos impermeáveis são capazes de embeber e germinar quando coletadas no ponto de maturidade fisiológica, antes do início da fase de dessecamento (GUI-FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Entretanto, a coleta em árvores que apresentam maturação fisiológica homogênea das sementes é um processo complexo, uma vez que a velocidade de maturação varia entre espécies e entre árvores de uma mesma espécie e altera-se conforme o ano e local de colheita (FIGLIOLIA, 1995).

Filippi et al. (2012) fizeram uma descrição minuciosa dos aspectos da semente e das plântulas de *A. leiocarpa*. A germinação foi classificada como epígea e as plântulas são do tipo fanerocotiledonar, com emergência curvada. Na Figura 4 pode ser observada a emissão da radícula (Figura 4 - A), detalhes da raiz principal e do desenvolvimento da coifa (Figura 4 – B a D), o colo (Figura 4 - E) e cotilédones (Figura 4 – F a G). Aos 25 dias a plântula está completamente formada, com raiz pivotante e raízes secundárias finas (Figura 4 – G e H). As

folhas são compostas, pecioladas, alternas, imparipenadas, base foliar arredondada ou obtusa, ápice acuminado, margem inteira, forma variável, de ovais a oval-lanceoladas, de elípticas a ovadoblongas (Figura 4 – I) (FILIPPI et al., 2012).

Figura 2 - Estádios sucessivos da germinação de *Apuleia leiocarpa*, plântula e muda. A – Emissão da radícula; B, C e D – 3°, 4° e 5° dia após a semeadura, respectivamente; E – Perda do tegumento; F - Abertura dos cotilédones entre o 5º e 7º dia de semeadura; G e H – Plântula; I – Muda (c – cotilédone; cf – coifa; co – colo; ep – epicótilo; f – folha; fo – folíolo; hp – hipocótilo; n – nervuras; pro – protófilo; r – radícula; rp – raiz primária; rs – raiz secundária; rt – raiz terciária; t - tegumento). Barra: 4 cm para A a H e 5 cm para I.



Fonte: Filippi et al., 2012.

Para a produção de mudas de grápia recomenda-se o uso de sementeiras, com posterior repicagem para sacos de polietileno. A germinação das sementes tem início entre 10 e 30 dias após a semeadura, levando até 80 dias para germinar sem tratamento pré-germinativo adequado (CARVALHO, 2003). Em estudo realizado por Felippi et al. (2012), a germinação de sementes dessa espécie teve início aos 7 dias após a semeadura, estendendo-se até os 160 dias, com germinação variando de 13 a 96% em sementes sem tratamentos de superação de

dormência. Nicoloso et al. (1997) obtiveram 9,40% de germinação, aos 5 dias após a semeadura e 32,1%, aos 70 dias, ao passo que, em sementes tratadas por 20 min com ácido sulfúrico concentrado (98º) houve 100% de germinação, já aos 5 dias de semeadura. Lando e Dorigon (2012) obtiveram, aos 15 dias de semeadura, 91,3% de germinação em sementes tratadas por 10 min em ácido sulfúrico concentrado (98º). Lencina et al. (2014) avaliou a germinação e o vigor de sementes de grápia submetidas à ácido sulfúrico e diferentes tratamentos de desinfestação, visando o estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas assépticas para a micropropagação. Neste trabalho, Lencina et a., (2014) observaram que, aos 30 dias, 92,5% de desinfestação e 84,3% de germinação das sementes tratadas em soluções com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (2,5 e 5,0% de cloro ativo), durante diferentes tempos de imersão (5, 10 ou 15 min). Variações na capacidade germinativa das sementes podem estar relacionadas com o estado nutricional da árvore matriz e/ou pelo estágio de maturação das sementes, visto que a coleta em árvores matrizes, com diferentes graus de maturidade das sementes, acarreta na produção de lotes desuniformes quanto à germinação das mesmas (FELIPPI et al., 2012).

2.2 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação ou propagação *in vitro* apresenta relevante potencial de aplicação para a multiplicação de genótipos de espécies florestais (OLIVEIRA et al., 2013). Além de ter contribuído para o desenvolvimento da silvicultura brasileira, permitindo o resgate e a multiplicação de espécies de interesse econômico do gênero *Eucalyptus* e que apresentam recalcitrância quanto a propagação vegetativa por outras técnicas. Isso se deve ao fato da micropropagação promover o rejuvenescimento dos propágulos por meio dos cultivos sucessivos, o que faz com que os tecidos em estado maduro retornem para um estado juvenil, retomando a capacidade de enraizamento (WENDLING; XAVIER, 2001).

Hoje, a maior parte dos estudos relativos ao cultivo *in vitro*, principalmente de espécies nativas, estão relacionados à multiplicação de genótipos de difícil propagação por métodos tradicionais (PELEGRINI et al., 2011) e à conservação de germoplasma *in vitro* de espécies que se encontram ameaçadas de extinção (MALOSSO et al., 2012).

Dentre as vantagens do uso da micropropagação para a propagação de plantas, destaca-se a possibilidade de propagação de árvores selecionadas (WENDLING et al., 2006),

a propagação vegetativa de genótipos de alto valor comercial e de difícil enraizamento e alta taxa de multiplicação, a qual acelera os programas de propagação clonal (TEIXEIRA, 2001). Também permite a obtenção de plantas livres de vírus, por meio de ápices caulinares e meristemas (WENDLING et al., 2006). A contaminação por microrganismos é limitante para a aplicação da micropropagação para algumas espécies nativas, assim como a recalcitrância ao cultivo *in vitro* (XAVIER et al., 2013).

A micropropagação consiste no uso de explantes provenientes de plantas estabelecidas *in vitro* (CARVALHO et al., 2006), propágulos coletados de plantas a campo ou de plantas produzidas em casa de vegetação, que após a desinfestação são cultivados, multiplicados, alongados e enraizados *in vitro* ou *ex vitro* (DUTRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013). As respostas das plantas às técnicas de micropropagação são variáveis e dependentes da espécie, variedade e/ou cultivar, época de coleta, tipo de explante e fases de cultivo (WENDLING et al., 2006). Dentre as fases de cultivo, o meio de cultura, os fitorreguladores, o uso de carvão ativado, entre outras, estão diretamente envolvidas no estabelecimento de metodologia eficiente de regeneração *in vitro* (ZHANG et al., 2003).

A primeira etapa consiste no estabelecimento *in vitro*, sendo considerada a fase mais crítica para a maioria das plantas lenhosas (FERMINO JUNIOR et al., 2009), especialmente quando utilizado explantes de plantas mantidas a campo, em função das altas taxas de contaminação por microrganismos (ERIG; SCHUCH, 2003) e oxidação fenólica (WERNER et al., 2009). O explante deve ser selecionado em função da disponibilidade do material, dos níveis de contaminação e do grau de juvenilidade do tecido vegetal (CARVALHO et al., 2006; CID; TEIXEIRA, 2010), podendo ser obtidos de diversas partes da planta, tais como raízes, hipocótilos, epicótilos, cotilédones, folhas e flores, grãos de pólen, embriões, óvulos, nós e gemas axilares ou apicais (CID; TEIXEIRA, 2010). Para espécies arbóreas nativas, o método mais utilizado na micropropagação é o estabelecimento de plântulas *in vitro*, as quais servem de fonte de propágulos para a multiplicação. Em função da dificuldade em se obter material de plantas adultas livre de patógenos e responsivos à propagação *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2013).

A oxidação do explante é altamente dependente do genótipo, da fase de desenvolvimento da planta e da estação do ano. Pode ser controlada pela adição ao meio de cultura de substâncias antioxidantes como ácido cítrico, ácido ascórbico, polivinilpirrolidone (PVP) e carvão ativado (WERNER et al., 2009). O carvão ativado possui propriedades

adsorventes dos exsudados fenólicos, além da capacidade de fixar cobre. O acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada modifica a composição do meio de cultura e, consequentemente, a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000). Sabe-se que tal reação é desencadeada no processo de senescência ou por injúria dos tecidos (ZHOU et al., 2003). Os compostos fenólicos sofrem oxidação pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas que, normalmente, inibem o crescimento dos explantes, ou ainda, promovem a morte dos mesmos (SATO et al., 2001). O carvão ativado também pode ser incorporado ao meio de cultura para melhorar o crescimento ou promover a organogênese dos explantes (PAN; STADEN, 1998).

Os meios de cultura possuem geralmente macronutrientes, micronutrientes, carboidratos (normalmente a sacarose) e outros compostos orgânicos suplementares (tais como vitaminas e aminoácidos). A escolha do meio de cultura ideal é imprescindível para a viabilização da micropropagação, pois além de fornecer os nutrientes necessários, preconiza o padrão de crescimento das plantas *in vitro* (THORPE et al., 1991; CALDAS et al., 1998). O meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) têm sido os mais utilizados para esta finalidade. O meio de cultura MS apresenta altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônio, quando comparado à outras formulações salinas (MURASHIGE; SKOOG, 1962; GEORGE, 1996). O meio de cultura WPM possui menores concentrações, principalmente de nitrogênio e potássio se comparado ao meio de cultura MS, sendo originalmente desenvolvido para plantas lenhosas (LLOYD; McCOWN, 1980; SAADAT; HENNERTY, 2002).

A multiplicação se dá quando os explantes já possuem um crescimento uniforme e adequado, em que o principal objetivo dessa etapa é produzir o maior número de gemas ou brotos possíveis, no menor intervalo de tempo e com o mínimo de variação genética entre os mesmos (LÉON, 2010). A qualidade e homogeneidade dos brotos produzidos durante a multiplicação também devem ser considerados, pois influencia o enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* (OLIVEIRA et al., 2013). O método mais utilizado na micropropagação de espécies florestais nativas baseia-se na proliferação de gemas axilares, isoladas de plântulas cultivadas *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2013). A obtenção de explantes para a multiplicação também pode ser feita a partir de plantas mantidas *in vitro*, para o fornecimento de microestacas para o enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*. A manutenção de microcepas *in vitro* tem por objetivo maximizar o aproveitamento dos propágulos de plântulas assépticas e a taxa de multiplicação,

como observado em louro-pardo - *Cordia trichotoma* Vell. Arrabida ex Steudel) (FICK, 2007; HEBERLE, 2010) e erva-mate – *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (HORBACH, 2008).

A suplementação dos meios de cultura com fitorreguladores pode auxiliar o direcionamento das respostas morfogênicas dos explantes (HARTMANN et al., 2011). O balanço hormonal é considerado um dos mais relevantes fatores que influenciam no sucesso da propagação de culturas *in vitro* (PASA et al., 2012). Nesse sentido, Skoog e Miller (1957) demonstraram que a formação de caules e raízes era controlada pelas concentrações relativas entre auxina e citocinina, em que o balanço favorável à citocinina resultava na formação de gemas caulinares em explantes de tabaco (*Nicotiana tabacum*). As citocininas possibilitam a formação de brotos pela superação de dominância apical (TAIZ; ZEIGER, 2013), aumentando a taxa de multiplicação. Entre as citocininas mais utilizadas destacam-se o BAP (6-benzilaminopurina), a KIN (cinetina), o 2-iP (2- isopentenil adenina) e a ZEA (zeatina). O BAP tem revelado eficiência no processo de multiplicação, tanto no desenvolvimento de gemas pré-existentes quanto na indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU; WANG, 1983), sendo a citocinina mais utilizada nos trabalhos de micropropagação de espécies arbóreas nativas (OLIVEIRA et al., 2013). Já balanços hormonais favoráveis à auxina promoveram a formação de raízes e balanços hormonais intermediários não levaram a uma diferenciação das células e sim a uma maior multiplicação delas e, consequente, a formação e o crescimento de calo (SKOOG; MILLER, 1957).

A obtenção de plantas completas vai depender da indução de raízes adventícias em brotos alongados durante a multiplicação, podendo o enraizamento ser realizado *in vitro* ou *ex vitro*. O enraizamento *in vitro* é realizado em meio de cultura, e nesse caso acredita-se obter um maior controle das fases de cultivo, maximizando o enraizamento de algumas espécies (LEITZKE et al., 2009). As plantas formadas *in vitro* são transferidas para substrato como terra de subsolo, turfa, casca de arroz, entre outros, e aclimatizadas em casa de vegetação (OLIVEIRA et al., 2013). Já no enraizamento *ex vitro*, as raízes são induzidas em explantes cultivados diretamente em substrato (OLIVEIRA et al., 2013), processo que ocorre concomitante à aclimatização. De acordo com Wendling et al. (2006), o enraizamento *ex vitro* é mais eficiente que o enraizamento *in vitro*, já que propicia sistema radicular com melhor qualidade, sob ponto de vista morfogênico, além de ser mais prático e econômico.

Para o enraizamento, especialmente de espécies lenhosas, as auxinas são comumente utilizadas por apresentar propriedade de promover a formação de primórdios radiculares

(WANG; ANDERSON, 1988). Nesse grupo de fitorreguladores destaca-se o ácido indolacético (AIA), o ácido 4-cloro indolacético (4-cloro IAA) e o ácido indolbutírico (AIB), sendo este último o mais utilizado em função dessa auxina não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração (HARTMANN et al., 2011; IACONA; MULEO, 2010).

A aclimatização é um dos processos indispensáveis para a obtenção de novas plantas (WENDLING et al., 2006) e consiste na transferência de plantas completas produzidas *in vitro* para o ambiente externo, devendo ser realizada de forma gradativa e cuidadosa. Explantes ou plantas produzidas *in vitro* apresentam elevado conteúdo de água (KUBOTA; KOZAI, 1992), além de alterações na estrutura da cutícula, nos depósitos de cera, e nas células do mesofilo e dos estômatos das folhas, tornando-os suscetíveis a rápida perda de água por transpiração (COSTA et al., 2008).

Tanto para a aclimatização das plantas enraizadas *in vitro*, quanto para o enraizamento *ex vitro*, o substrato é um fator importante, pois ele pode facilitar ou impedir o crescimento, conforme a escolha do tipo de substrato, a definição das proporções dos componentes de uma mistura e as respectivas propriedades físico-químicas (SKREBSKY et al., 2006). Espaço de aeração associado à elevada capacidade de retenção de água dos substratos são fatores fundamentais para a aclimatização (GIRARDI; PESCADOR, 2010), variando entre os diversos substratos utilizados, tais como substratos comerciais, areia, terra de subsolo, fibra de coco, vermiculita, casca de arroz carbonizada, entre outros. Sendo assim, a escolha do substrato adequado, a manutenção da umidade relativa do ar e o controle da temperatura e da luminosidade devem ser definidas, para minimizar o estresse e maximizar a sobrevivência das plantas durante a aclimatização (OLIVEIRA et al., 2013).

Apesar dos grandes avanços obtidos nos últimos anos, a propagação vegetativa de espécies arbóreas nativas ainda é um desafio, principalmente devido à falta de informações sobre o padrão de desenvolvimento das espécies *in vitro* e das condições adequadas de cultivo. A grápia é uma espécie arbórea nativa brasileira que apresenta poucas informações referentes à propagação vegetativa, sendo relevantes os estudos para definir estratégias de produção de mudas via assexuada.

2.3 VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A variabilidade genética tem papel fundamental para a evolução das espécies, pois condiciona a adaptação às mudanças no ambiente. Em uma população, o processo de seleção natural é realizado com base nas diferenças que existem entre os indivíduos, onde os genótipos mais favoráveis têm maiores chances de perpetuação, devido ao sucesso reprodutivo e adaptativo (FUTUYMA, 2002). Além disso, o conhecimento de como a variabilidade genética está distribuída dentro e entre as populações naturais é essencial, pois permite que decisões mais precisas sejam tomadas para a definição de estratégias de conservação, de melhoramento genético e para o desenvolvimento de estratégias de manejo sustentado (KAGEYAMA et al., 2003). Para espécies em risco de extinção, com restrita distribuição e ainda espécies raras, os estudos de análise genética assumem ainda maior importância (JUCHUM et al., 2007). No caso de espécies arbóreas tropicais, o conhecimento da estrutura genética das populações naturais é limitado, em função da alta diversidade e complexidade (KAGEYAMA et al., 2003).

Fatores inerentes à espécie, como o modo de reprodução (sexual ou assexual), taxa de fecundação cruzada (autógamas, autógamas com frequente alogamia ou alógamas), a expressão sexual, bem como alguns fatores ambientais, apresentam efeito marcante na distribuição das frequências genotípicas e afetam o potencial de recombinação das populações (KEVIN et al., 2004; MARQUARDT; EPPERSON, 2004; ZANETTINI; CAVALLI, 2003).

A reprodução sexual é baseada no processo meiótico de divisão celular, a qual é fundamental para a ampliação da variabilidade genética, por meio dos mecanismos de recombinação gênica, pela segregação aleatória dos cromossomos homólogos, ou ainda pelas diversas possibilidades de união dos gametas femininos e masculinos durante a fecundação (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000). Em contrapartida, na reprodução assexuada não ocorre recombinação e, portanto, tende a reduzir a variabilidade genética, resultando em plantas com menor capacidade de se adaptar as mudanças nas condições ambientais se comparadas às plantas da mesma espécie reproduzidas sexuadamente (RAVEN et al., 2007). Assim, o modo de reprodução é determinante na distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações, pois determinam a forma de cruzamento e as síndromes de dispersão de pólen e sementes (SEOANE et al., 2000).

As espécies que se reproduzem via sexuada são classificadas como alógamas, autógamas e autógamas com frequente alogamia (BORÉM; MIRANDA, 2013). O conhecimento do modo de reprodução permite o delineamento de estratégias que otimizem a amostragem da variabilidade genética e a adoção de modelos genéticos e estatísticos apropriados para a estimativa de parâmetros genéticos (HAMRICK et al., 1993). Espécies alógamas são caracterizadas pelo constante intercruzamento entre indivíduos, mediante a união entre gametas de diferentes plantas ao longo das gerações (ZANETTINI; CAVALLI, 2003). Além disso, a variabilidade genética se distribui dentro e entre as populações, sendo que espécies alógamas, tropicais, perenes e de ciclo longo, a maioria da variabilidade genética encontra-se distribuída dentro das populações e uma pequena parte da mesma é encontrada entre as populações estudadas (HAMRICK; GODT, 1989). Em contrapartida, espécies autógamas apresentam base genética mais restrita, devido ao processo de autofecundação, que restringe o intercruzamento e leva a população à homozigose (DESTRO; MONTALVÁN, 1999), resultando em variabilidade genética distribuída entre as populações (HAMRICK et al., 1993). O sistema misto de reprodução, por sua vez, apresenta variabilidade genética intermediária entre espécies autógamas e alógamas, sendo dependente do balanço dessas duas formas de reprodução (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

A variabilidade genética existente entre os diferentes indivíduos, dentro de uma população, assim como entre populações de uma espécie, pode ser detectada por meio de marcadores genéticos, os quais consistem em características qualitativas, com herança mendeliana simples, facilmente reconhecida e cuja expressão é pouco influenciada pelo ambiente (ROBINSON, 1998). As características morfológicas foram os primeiros marcadores genéticos utilizados, entretanto apresentavam a desvantagem de não permitir a distinção de plantas heterozigotas, além da possibilidade de exercer influência sobre o valor adaptativo da planta. Posteriormente, foram desenvolvidos os marcadores genéticos bioquímicos, os quais são produtos da expressão de genes, e tiveram grande aceitação pela comunidade científica, pois permitiram que muitas das dificuldades detectadas pelo uso dos marcadores morfológicos fossem resolvidas (BRAMMER, 2000). Posteriormente, foram desenvolvidos os marcadores moleculares, devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA, sendo os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição) o primeiro tipo de marcador molecular (BOTSTEIN et al., 1980). Tanto marcadores bioquímicos quanto os moleculares

não interferem no processo biológico que se deseja estudar e podem ser identificados em qualquer idade da planta (ROBINSON, 1998).

A descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) na década de 80 possibilitou a visualização de fragmentos específicos de DNA e rapidamente se tornou uma das técnicas mais usadas em laboratórios por todo o mundo, devido à sua simplicidade, rapidez e baixo custo (JOSHI; DESHPANDE, 2010). O desenvolvimento da PCR possibilitou o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares, que provocou grande impulso na geração de dados moleculares em várias espécies (CAIXETA et al., 2009).

Grande variedade de marcadores moleculares foram desenvolvidos para a análise e detecção de variabilidade genética ao nível de DNA, em muitas espécies vegetais (CAIXETA et al., 2009), fundamentais para realizar a análise genética, quantificar a variabilidade dentro e entre populações, entre outros fins (BECKMANN et al., 2006). Os marcadores moleculares vêm sendo empregados em estudos de diversidade e estrutura genética de espécies florestais desde os anos 1980 (GRATTAPAGLIA, 2007). Os marcadores baseados em PCR incluem o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), os microssatélites ou STR (*Short Tandem Repeats*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SRAP (*Sequencerelated Amplified Polymorphism*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), entre outros.

Marcadores RAPD são fragmentos de tamanho variável, gerados a partir da amplificação com um oligonucleotídeo iniciador constituído de bases arbitrárias (geralmente 10 nucleotídeos) (WILLIAMS et al., 1990). Essa estratégia eliminou a necessidade do conhecimento prévio dos fragmentos a serem amplificados. As bases moleculares do polimorfismo revelado pela técnica RAPD podem ser mutações de ponto no sítio de pareamento do iniciador, que impedem o pareamento e a consequente amplificação do fragmento de DNA, assim como deleções ou inserções entre dois sítios de pareamento do iniciador, distanciando-os e impossibilitando a amplificação (CAIXETA et al., 2009).

As grandes vantagens da técnica RAPD são a simplicidade, a rapidez de obtenção dos dados, o custo relativamente reduzido e a aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo. Também, por ser um marcador baseado em PCR, necessita de uma quantidade reduzida de DNA para a análise genética de um indivíduo. Os RAPDs constituem uma classe de marcadores que garante uma boa amostragem do genoma, permitindo a detecção de polimorfismo por um custo relativamente baixo (PIGATO; LOPES, 2001). No entanto, os marcadores RAPD apresentam algumas desvantagens, que podem ser limitantes para a

utilização em determinadas situações. Uma das principais limitações da técnica é o baixo conteúdo de informação genética em cada loco, pois apenas um alelo é detectado pelo fragmento amplificado, sendo as demais variações alélicas classificadas conjuntamente como um alelo nulo (CAIXETA et al., 2009).

Por serem marcadores especialmente oportunos para espécies em que não há conhecimento prévio sobre o genótipo ou mesmo sobre a estrutura genética das populações, os marcadores RAPD têm proporcionado um grande avanço na análise de polimorfismo molecular e na geração de dados genéticos em um grande número de espécies (CAIXETA et al., 2009). Para a grápia, até o presente momento, não há informações referentes à variabilidade genética com uso de marcadores moleculares, o que justifica a utilização do RAPD para estudos genéticos.

3 CAPITULO I

RESUMO

PRODUTIVIDADE DE MICROCEPAS DE GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa*) MANTIDAS *in vitro*

AUTORA: Kelen Haygert Lencina
ORIENTADOR: Dilson Antônio Bisognin

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produtividade de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidas em diferentes fases de cultivo *in vitro*, visando maximizar a taxa de multiplicação. Microcepas oriundas da poda drástica de plantas assépticas foram cultivadas em meio de cultura WPM acrescido de 0, 2,2, 4,4, 6,6 e 8,8 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e subcultivadas em meio de cultura WPM sem citocinina. Microcepas de grápia também foram cultivadas em meio de cultura WPM, MS ou ½ MS, acrescido ou não de 1,5 g L^{-1} de carvão ativado e submetidas a três coletas de brotos aos 30, 60 e 90 dias de cultivo. A manutenção das microcepas em meio de cultura WPM ou ½ MS suplementado com 8,8 µM de BAP, seguido do subcultivo em meio de cultura sem citocinina, aumenta o número e o comprimento das brotações. O cultivo de microcepas de grápia em meio de cultura com carvão ativado aumenta a produção de microestacas por microcepas, enquanto a ausência de carvão ativado favorece a formação de calos e brotos por organogênese indireta. A manutenção *in vitro* de microcepas de grápia maximiza a taxa de multiplicação, constituindo-se de uma técnica promissora para a produção de plantas de grápia.

Palavras-chave: Micropropagação, Microestacas, Conservação *in vitro*, BAP, Carvão ativado.

ABSTRACT

IN VITRO PRODUCTIVITY OF APULEIA (*Apuleia leiocarpa*) MICROSTUMPS

AUTHOR: Kelen Haygert Lencina
ADVISOR: Dilson Antônio Bisognin

The aim of this work was to evaluate the in vitro productivity of apuleia (*Apuleia leiocarpa*) micro-stumps cultivated in different media conditions to maximize its multiplication rate. Micro-stumps from aseptic seedlings were cultivated in WPM medium added with 0, 2.2, 4.4, 6.6 and 8.8 µM of 6-benzylaminopurine (BAP) and sub cultured in WPM medium without cytokinin. Micro-stumps were also cultivated in WPM, MS or ½ MS base media with or without the addition of 1.5 g L^{-1} of activated charcoal and submitted to drastic pruning at 30, 60 and 90 days of cultivation. The in vitro cultivation of apuleia micro-stumps in WPM or ½ MS media added with 8.8 µM of BAP and sub cultivation in media without cytokinin increase the number and length of shoots. The cultivation of apuleia micro-stumps in media with activated charcoal increases the productivity of micro-cuttings per micro-stumps, but in the absence of activated charcoal induces callus formation and indirect organogenesis of shoots. The in vitro conservation of apuleia micro-stumps maximizes the multiplication rate, being a feasible technique for the production of apuleia plantlets.

Keywords: Micropropagation. Micro-cuttings. *In vitro* conservation. BAP. Activated charcoal.

3.1 INTRODUÇÃO

A grápia [*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride] é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, pertencente à família Fabaceae, empregada em marcenaria, esquadrias, carrocerias, trabalhos de tornearia e para a construção civil (LORENZI, 2008). Além de fornecer madeira de elevada qualidade, apresenta relevante importância ecológica em vegetação secundária, por ser espécie pioneira que colabora eficientemente no desenvolvimento da vocação florestal dessas áreas (BACKES; IRGANG, 2004). Além disso, Carvalho (2003) afirma que *A. leiocarpa* deve ser considerada como uma das mais valiosas espécies da Floresta Estacional Decidual, pois se trata de um aspecto fisionômico para classificação dessa tipologia florestal (KLEIN, 1972). Atualmente, é considerada ameaçada de extinção pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA, 2012) e pelo Decreto Estadual nº 52.109, de 1º de dezembro de 2014.

A espécie apresenta frutificação irregular ao longo dos anos e sementes com tegumento impermeável à água (CARVALHO, 2003). As taxas de germinação das sementes de grápia mostram-se bastante variada, sendo observados valores de 13 a 96% em sementes sem tratamento para a superação da dormência (DE MARCO et al., 2012; FILIPPI et al., 2012; HENICKA et al., 2006; NICOLOSO et al., 1997) o que pode dificultar a reprodução sexuada. Problemas relacionados à produção de sementes e mudas pode ser contornado pelo uso da propagação vegetativa, a qual também permite a obtenção de plantas uniformes e a fixação de características favoráveis por meio do resgate e multiplicação de indivíduos selecionados em qualquer fase do programa de melhoramento genético (BISOGNIN, 2011; FERRARI et al., 2004; BORÉM; MIRANDA, 2013).

No Brasil foram desenvolvidas importantes tecnologias de propagação vegetativa que aperfeiçoaram a técnica de estaquia, primeiramente a microestaquia seguida da miniestaquia, as quais viabilizaram o processo de produção de mudas de clones de difícil enraizamento (XAVIER; SILVA, 2010). Os dois sistemas diferenciam-se basicamente pela origem da muda que compõe o sistema de cultivo, em que no microjardim clonal as plantas fornecedoras de propágulos provêm da micropropagação e são denominadas microcepas, enquanto no minijardim clonal, as minicepas são oriundas da estaquia ou de sementes (XAVIER; SILVA, 2010). A grande contribuição da microestaquia para a silvicultura de eucalipto baseia-se na possibilidade de resgate de genótipos de difícil enraizamento, visto que os sucessivos subcultivos *in vitro* promovem o rejuvenescimento e revigoramento das plantas micropropagadas (ASSIS; MAFIA, 2007), que resultam em rápido estímulo para a iniciação e o crescimento de raízes adventícias (DUTRA et al., 2009).

A manutenção *in vitro* de microcepas consiste na aplicação concomitante das metodologias preconizadas pelas micropropagação e microestaquia com vistas no fornecimento continuado de microestacas para o enraizamento. Dentre as vantagens que se propõe para essa metodologia é possibilitar o aproveitamento dos propágulos de plântulas assépticas, das quais são geralmente retirados os segmentos nodais e apicais para serem utilizados na multiplicação *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2013) e o restante sendo descartado o restante da parte aérea e do sistema radicular, que se constitui em uma microcepa. Além disso, permite maximização da taxa de multiplicação, visto que inúmeras coletas podem ser realizadas associada a conservação de germoplasma.

Para louro-pardo [*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel], a manutenção *in vitro* de microcepas mostrou-se um método promissor para a multiplicação *in vitro* (FICK, 2007; HEBERLE, 2010), sendo o mesmo observado para erva-mate [*Ilex paraguariensis* (Saint) Hilaire] (HORBACH, 2008). Para a grápia [*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride] também foi avaliada a manutenção *in vitro* de microcepas (LENCINA, 2013).

Estudos preliminares relacionados ao estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas e à manutenção *in vitro* de microcepas de grápia, mostraram que as microcepas podem servir de fonte de propágulos livres de contaminantes e com características juvenis para condução da etapa de multiplicação e o posterior enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* (LENCINA, 2013; LENCINA et al., 2014). Mais estudos foram recomendados, principalmente relacionados às condições de cultivo das microcepas, avaliações da taxa de multiplicação em sucessivos subcultivos e quanto à competência dos explantes para a formação de raízes adventícias de grápia (LENCINA, 2013). Baseado no exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a manutenção e a produtividade de brotações *in vitro* de microcepas de grápia para maximizar a taxa de multiplicação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

As plântulas assépticas utilizadas para formar as microcepas foram obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes de grápia oriundas de três plantas matrizes localizadas em Ijuí, RS. As plântulas foram semeadas em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), conforme protocolo estabelecido por Lencina et al. (2014). Em todos os experimentos, os cultivos foram realizados em frascos de vidro (150 mL) com aproximadamente 40 mL de meio de cultura, esterilizado por autoclavagem durante 20 min. à temperatura de 121 ºC e pressão de 1 atm. Foi utilizado um explante por frasco. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, e os cultivos mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 ºC e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de 14,3 µE m^{-2} S^{-1} fornecida por lâmpadas fluorescentes.

No primeiro experimento foram avaliadas a manutenção e produtividade de brotações das microcepas, as quais foram submetidas a diferentes concentrações de BAP e diferentes fases de cultivo. Plantas assépticas de grápia com 15 dias de idade foram submetidas à poda da parte aérea, com corte realizado acima das folhas cotiledonares, formando-se as

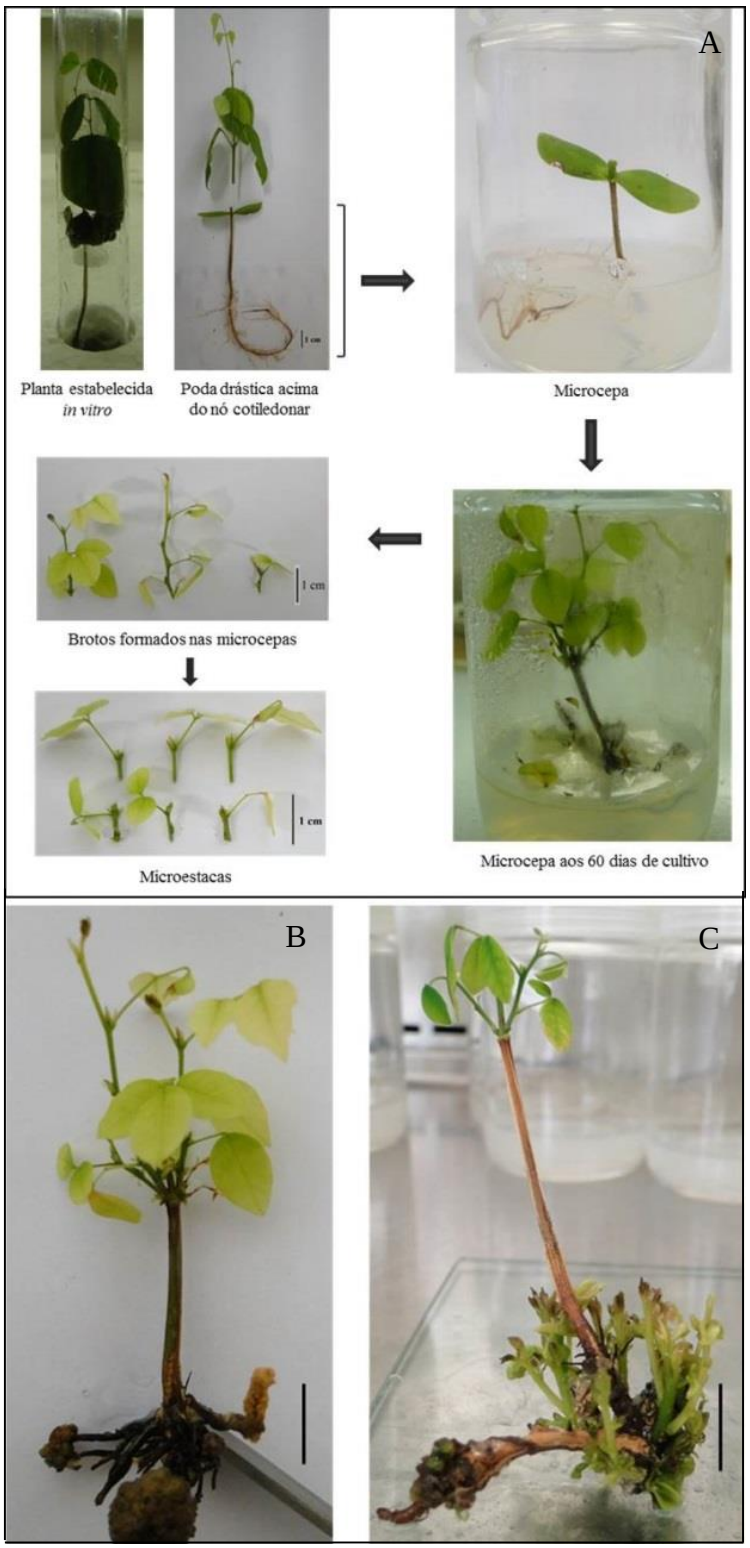
microcepas (Figura 3 A), as quais foram transferidas para o meio de cultura WPM suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, 0,1 g L^{-1} de inositol, 6 g L^{-1} de agar e das concentrações 0, 2,2, 4,4, 6,6 e 8,8 µM de BAP para cultivo inicial. Após a avaliação, as microcepas foram novamente submetidas à poda da parte aérea e subcultivadas em meio de cultura WPM sem citocinina, para avaliar o efeito residual das concentrações de BAP.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial 5 x 2, consistindo de cinco concentrações de BAP e duas fases de cultivo, com cinco repetições de quatro microcepas. Aos 30 dias de cultivo inicial e aos 30 dias do subcultivo as microcepas foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência e de regeneração de brotos, o número e comprimento (cm) dos brotos por microcepa e o número de microestacas por broto e por microcepa.

No segundo experimento foram estudadas a manutenção e produtividade de brotos das microcepas em diferentes meios de cultura, presença ou não de carvão ativado em três coletas sucessivas de brotos. Plantas assépticas de grápia estabelecidas conforme Lencina et al. (2014), com 15 dias de idade, foram submetidas à poda da parte aérea para formar as microcepas (Figura 3) e transferidas para meio de cultura WPM, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou ½ MS (MS com metade da concentração de sais minerais e vitaminas), na presença ou não de carvão ativado (1,5 g L^{-1}) e suplementado com 8,8 µM de 6-benzilaminopurina (BAP), 30 g L^{-1} de sacarose, 0,1 g L^{-1} de inositol e 6 g L^{-1} de agar.

O experimento foi um fatorial 3 x 2 x 3, consistindo em três meios de cultura, carvão ativado e três coletas sucessivas, no delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições de cinco microcepas, totalizando 50 microcepas por tratamento. As microcepas foram avaliadas aos 30, 60 e 90 dias de cultivo (primeira, segunda e terceira coleta), sendo realizada a poda drástica da microcepa após cada avaliação e adicionado 20 mL de meio de cultura líquido, contendo os mesmos componentes do meio semissólido. As microcepas foram avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência e de regeneração de brotos, ao número e comprimento (cm) dos brotos por microcepa, ao número de microestacas por broto e por microcepa. Além disso, foram avaliadas a porcentagem de calogênese, de organogênese no calo e de oxidação.

Figura 3 - Etapas para a formação de microcepas e para o preparo de microestacas de grápia (A), microcepa com formação de calo na raiz (B) e organogênese no calo da microcepas (C).



Para atender aos pressupostos da normalidade, os dados de porcentagem foram transformados para arcoseno $\sqrt{x/100}$ e de número para $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos com diferenças significativas ($P \leq 0,05$) foram comparadas pelo teste de Tukey, com o auxílio do programa ESTAT (Unesp - Jaboticabal).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação ($P > 0,05$) entre as concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultura e as fases de cultivo, que consistiu no cultivo inicial em diferentes concentrações de BAP e subcultivo em meio de cultura livre de citocinina. As microcepas de grápia apresentaram média de sobrevivência de 97,8% e 100% de regeneração de brotos, indicando que as condições de manutenção *in vitro* de microcepas de grápia foram satisfatórias (Tabela 1). A alta taxa de sobrevivência das microcepas pode ter sido influenciada pelo manejo adequado nas fases iniciais da micropropagação, o qual foi descrito por Lencina (2013).

A adição de diferentes concentrações de BAP afetou apenas o número de brotos por microcepa, com melhores respostas no tratamento com 8,8 µM de BAP, mas sem diferir do tratamento com 6,6 µM (Tabela 1). Esta variável é de grande importância, sendo que quanto maior o número de brotos, possivelmente maior será o número de explantes disponíveis para a próxima fase da micropropagação, o enraizamento adventício. Este resultado provavelmente ocorreu devido à adição de fitorreguladores no meio de cultura, como o BAP, o qual apresenta a função de estimular fortemente os processos morfogenéticos, como o desenvolvimento de gemas axilares pré-existentes ou a indução de gemas adventícias, ambas fundamentadas na divisão e diferenciação celular (RIBEIRO et al., 2012; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Além da suplementação do meio de cultura com citocinina, vale salientar que as microcepas apresentam o sistema radicular, os quais correspondem aos principais locais de síntese desse fitorregulador (TAIZ e ZEIGER, 2013). Assim, é possível que o conteúdo endógeno tenha contribuído para as repostas morfogênicas, proporcionando uma alta relação citocinina/auxina, favorecendo a emissão das brotações (HARTMANN et al., 2011). Essa hipótese é corroborada pelo fato da gema apical ter sido retirada pela poda drástica, visto que a gema apical apresenta elevada concentração de IAA (ácido indolil-3-acético), auxina que determina a dominância apical, a qual, por sua vez, auxilia na manutenção de altos níveis de

ABA (ácido abscísico) nas gemas laterais que inibem seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Tabela 1 – Porcentagem de sobrevivência (S%) e brotação (B%) das microcepas, número de brotos (NB), comprimento dos brotos (CB), número de microestacas por broto (MB) e por microcepa (MM) de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina.

Tratamento	S (%)	B (%)	NB	CB (cm)	MB	MM
BAP (µM)						
0,0	94,2 a*	100 a	1,8 b	2,3 a	1,5 a	2,7 a
2,2	100,0 a	100 a	2,0 b	2,4 a	1,7 a	3,5 a
4,4	100,0 a	100 a	2,0 b	2,5 a	1,8 a	3,2 a
6,6	95,0 a	100 a	2,2 ab	2,7 a	1,9 a	3,9 a
8,8	100,0 a	100 a	2,8 a	2,7 a	1,5 a	3,7 a
Fases de cultivo[1]						
Cultivo inicial	7,0 a	100 a	2,0 a	1,0 b	1,2 b	2,4 b
Subcultivo	8,6 a	100 a	2,3 a	4,0 a	2,1 a	4,5 a
Média	97,8	100	2,1	2,5	1,7	3,5
CV (%)	10,3	-	10,7	10,2	12,9	13,7

*Valores seguidos de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro.

[1]Cultivo inicial em meio de cultura suplementado com 8,8 µM de BAP e subcultivo em meio de cultura isento de BAP.

As fases de cultivo influenciaram o comprimento dos brotos e o número de microestacas por broto e por microcepa, em que as respostas foram superiores no subcultivo (Tabela 1). É possível que esta resposta esteja relacionada com o efeito das concentrações de BAP utilizadas no cultivo inicial das microcepas, já que o subcultivo foi realizado em meio isento de citocinina. Sabe-se que os efeitos dos fitorreguladores adicionados aos meios de cultura não se restringem ao cultivo inicial, podendo ocorrer efeito residual de um cultivo para outro (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Apesar de ter sido avaliado apenas uma fase de cultivo na presença de citocinina e uma de subcultivo na ausência dessa, pode-se observar

que as microcepas de grápia mantiveram a capacidade de formação de brotos durante ambas as fases de cultivo. Estes resultados sugerem que os efeitos benéficos das citocininas no estímulo à proliferação de gemas persistiram após o subcultivo das plantas sem fornecimento de citocinina exógena. Resultados semelhantes foram obtidos em *Eucapyptus* (GRATTAPAGLIA et al., 1987), *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (FLORES et al., 2007) e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (FLORES et al., 2009). No cultivo *in vitro* de *P. glomerata*, os brotos com maior crescimento e vigor foram observados nos segmentos nodais cultivados em 1,0 e 5,0 µM de BAP ou Tidiazuron (TDZ) e subcultivados em meio isento de citocinina (FLORES et al., 2009). Para *P. tuberosa*, as citocininas têm sido utilizadas apenas na fase de multiplicação, sendo o alongamento e o enraizamento dos brotos conduzidos em meio isento desses fitorregulador (FLORES et al., 2007).

Não houve interação ($P > 0,05$) entre o tipo de meio de cultura, a adição ou não de carvão ativado e as coletas sucessivas na manutenção e produtividade de brotações nas microcepas para todas das variáveis analisadas (Tabelas 2 e 3). A sobrevivência e a brotação das microcepas não foram influenciadas por nenhum dos fatores testados, apresentando médias de 99,6 e 99,4% respectivamente, indicando que as condições avaliadas para manutenção *in vitro* de microcepas de grápia também foram satisfatórias nesse experimento (Tabela 2).

Quanto à influência dos diferentes meios de cultura, o número de microestacas por broto e por microcepa não variaram significativamente. Já o maior número de brotos foi observado no meio de cultura ½ MS, mas sem diferir significativamente do meio de cultura MS. Para o comprimento dos brotos, o meio de cultura WPM resultou nas maiores respostas, mas sem diferir do meio de cultura ½ MS (Tabela 2). É possível que estas repostas tenham relação com o fato do meio de cultura WPM apresentar 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, assim como o ½ MS corresponder a metade da concentração de sais do meio MS. Além disso, o meio de cultura WPM foi desenvolvido especialmente para espécies lenhosas, para as quais modificações como a redução da concentração de macronutrientes apresentam melhor desempenho (BERTOZZO; MACHADO, 2010).

Tabela 2 - Porcentagem de sobrevivência (S%) e brotação (B%) das microcepas, número de brotos (NB), comprimento dos brotos (CB), número de microestacas por broto (MB) e por microcepas (MM) de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura com 8,8 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP) e suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas.

Tratamento	S (%)	B (%)	NB	CB (cm)	MB	MM
Meio de cultura						
WPM	100,0 a*	98,9 a	2,6 b	1,9 a	2,3 a	5,9 a
MS	99,4 a	100,0 a	2,9 ab	1,6 b	2,2 a	6,0 a
½ MS	99,6 a	99,4 a	3,1 a	1,8 ab	2,2 a	6,2 a
Carvão ativado						
0	99,4 a	98,9 a	3,2 a	1,4 b	1,9 b	5,8 b
1,5	100,0 a	100,0 a	2,5 b	2,1 a	2,6 a	6,3 a
Coletas						
1º (30 dias)	100,0 a	100,0 a	2,6 b	2,8 a	2,9 a	7,4 a
2º (60 dias)	99,0 a	99,4 a	2,8 ab	1,5 b	2,2 b	6,2 b
3º (90 dias)	100,0 a	98,9 a	3,1 a	0,9 c	1,5 c	4,6 c
Média	99,6	99,4	2,8	1,7	2,2	6,1
CV (%)	4,8	4,8	9,5	9,3	10,0	14,4

*Valores seguidos de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro.

A adição de carvão ativado ao meio de cultura afetou o número e comprimento dos brotos, assim como o número de microestacas por broto e por microcepa (Tabela 2). A manutenção das microcepas em meio de cultura sem carvão ativado resultou em maior número de brotos (Tabela 2). Esta resposta pode estar associada à maior disponibilidade de BAP para as microcepas nos meios de cultura sem carvão ativado, já que este possui a propriedade de adsorver, entre outras substâncias, fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, apesar de não se conhecer ao certo a quantidade que pode ser adsorvida pelo mesmo (LEITZKE et al., 2009). Nesse caso, a presença de carvão ativado no meio de cultura pode ter ocasionado a redução dos teores de citocinina adicionada ao meio de cultura e seu consequente efeito na superação da dominância apical, o que resultou em menor número de brotações nas microcepas mantidas em meio de cultura com carvão ativado (Tabela 2). Como

mencionado anteriormente, as citocininas, como a BAP, atuam no estímulo a divisão e diferenciação celular e são importantes na regulação da morfogênese em explantes (TAIZ; ZEIGER, 2013). Cabe ressaltar que, apesar da menor formação de brotos nas microcepas cultivadas em meio de cultura com carvão ativado, estes se mostraram vigorosos e com coloração verde intensa, o que não foi observado nas microcepas mantidas em meio de cultura sem carvão ativado, onde possivelmente havia mais citocinina disponível. Essa hipótese é corroborada por Flores et al. (2009), que observaram efeitos negativos das citocininas no crescimento e coloração dos brotos, bem como no desenvolvimento do sistema radicular, efeito sanados após a transferência do material para meio isento de citocinina.

O carvão ativado também promoveu o aumento do comprimento das brotações e do número de microestacas por brotação e por microcepa. Essa substância é adicionado ao meio de cultura no intuito de otimizar o crescimento e o desenvolvimento celular nas diferentes fases da cultura de tecidos (VIEITEZ et al., 2009). Entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de ação do carvão ativado na adsorção de compostos fenólicos nos cultivos *in vitro*, sendo utilizado em protocolos de regeneração de espécies lenhosas (GOMES et al., 2010; GUTIÉRREZ et al., 2011; SARTOR et al., 2013) com o intuito de diminuir a taxa de oxidação dos explantes. A oxidação dos explantes é uma das principais dificuldades no estabelecimento de protocolos eficientes para cultura de tecidos de espécies arbóreas (SOARES et al., 2014). Desse modo, apesar do carvão ativado não ter contribuído para o aumento do número de brotações, o mesmo maximizou o número de microestacas por brotação, variável que define a taxa de multiplicação *in vitro*.

Houve diferenças significativas entre as coletas sucessivas para o número e comprimento dos brotos, bem como para o número de microestacas por broto e por microcepa. O número de brotos foi superior na terceira coleta, mas sem diferir da segunda coleta (Tabela 2). Esse aumento no número de brotos formados nas microcepas de grápia após as sucessivas coletas equivale a 16% de acréscimo da primeira para a terceira coleta. Este resultado provavelmente ocorreu devido às podas sucessivas realizadas aliadas à adição de meio de cultura líquido suplementado com BAP. Esses procedimentos podem ter contribuído para o estabelecimento de balanço hormonal entre auxinas e citocininas favorável às citocininas, beneficiando assim a organogênese. Resultado semelhante foi observado por Soares et al. (2007) em estudo sobre o efeito residual das citocininas no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. Esse autor ressaltou que o número de brotos formados em

explantes caulinares se manteve constante durante três subcultivos em meio de cultura com citocinina e uma redução em subcultivos em meio de cultura sem citocinina. Em contrapartida, Lima e Moraes (2006) mencionam que redução nas taxas de multiplicação entre os subcultivo possa ser em função do acúmulo da citocinina no explante, sendo uma das maneiras para tentar maximizar a produção de brotos a alternância de concentrações altas e baixas de citocinina.

O comprimento dos brotos foi superior na primeira coleta, apresentando redução de 67,8% para a terceira coleta. Este resultado já era esperado, visto que alguns autores verificaram que o maior número de brotos implica em menor comprimento das brotações e vice-versa (COUTO et al., 2004; FRANZIN et al., 2004). Isto ocorreu devido à necessidade de maiores quantidades de nutrientes pra o desenvolvimento da brotação após sua regeneração (FRANZIN et al., 2004), que poderá ter causado uma relação de competição entre os processos de desenvolvimento e crescimento dos brotos. A competição determina a distribuição dos açúcares de transporte entre os vários tecidos-drenos da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O número de microestacas por broto e por microcepa foi significativamente superior na primeira coleta, apresentando redução de 48,3% e 37,8%, respectivamente, quando comparada à terceira coleta (Tabela 2). Resultados similares foram observados por Lima e Moraes (2006), os quais observaram que houve uma redução nas taxas de multiplicação entre os subcultivo de *Musa* spp. Este resultado provavelmente ocorreu devido às coletas realizadas nas microcepas de grápia terem sido realizadas em intervalos de 30 dias, período que pode ter sido insuficiente para a formação de novas gemas e desenvolvimento dos brotos. Possivelmente, o uso de concentração de carvão ativado superior a utilizada neste estudo, e/ou ainda, o aumento do intervalo entre as coletas sucessivas, possibilitaria maior alongamento dos brotos, número de microestacas e maior facilidade de manipulação dos brotos e aproveitamento dos explantes.

Neste estudo, foi observada a formação de calos nas raízes das microcepas de grápia (Figura 3 B), organogênese nos calos (Figura 3 C) e oxidação. O meio de cultura influenciou apenas na formação de calo, em que a maior resposta foi observada em meio de cultura ½ MS (Tabela 3). O carvão ativado influenciou a porcentagem de calo, de organogênese dos calos e a oxidação das microcepas da grápia. Microcepas mantidas em meio de cultura sem carvão ativado apresentaram 97,6% de calo, diferindo significativamente das microcepas mantidas

em meio de cultura com adição de carvão ativado, as quais apresentaram 1,6% de calo (Tabela 3). A maior formação de calos em raízes de microcepas cultivadas em meio de cultura sem carvão ativado pode estar relacionada à capacidade deste em adsorver diversos componentes do meio de cultura, inclusive as citocininas, que atuam diretamente na indução de calos em explantes de espécies lenhosas (WERNER et al., 2009). Também, os calos formados nas raízes das microcepas mantidas em meio de cultura sem carvão ativado apresentaram elevada capacidade morfogênica, com a formação de brotação múltipla em 58,4%, o que não foi verificado nos calos das raízes das microcepas mantidas em meio de cultura com carvão ativado, que não apresentaram a formação de brotos. A citocinina pode atuar na calogênese devido ao seu efeito na proliferação e diferenciação celular ou com ação similar à auxina, atuando na indução da competência embriogênica (SINGH et al., 2003). Além disso, a aplicação de citocininas exógenas pode aumentar o conteúdo endógeno de diferentes tipos de citocininas e consequentemente a taxa proliferativa (BARBOZA et al., 2014). Segundo Pintos et al. (2002), altas concentrações de KIN exógena em culturas de calos, podem aumentar o conteúdo total de citocininas endógenas após três meses de cultivo.

As diferentes coletas não influenciaram significativamente a porcentagem de calo, sendo observada média de 49,6% ao final das avaliações (Tabela 3). Já para porcentagem de calos com a formação de brotos e para oxidação houve diferença significativa entre as coletas sucessivas. Ambas as variáveis apresentaram tendência crescente no decorrer das coletas sucessivas, com maiores respostas na terceira coleta.

Nas raízes das microcepas de grápia mantidas em meio de cultura sem carvão ativado também foi observada 67,1% de oxidação, significativamente superior ao tratamento com carvão ativado, no qual não foi verificada oxidação (Tabela 3). Esse resultado pode estar associado ao efeito adsorvente do carvão ativado, que imobiliza parte das substâncias presentes no meio de cultura, incluindo compostos fenólicos produzidos pelos explantes (WERNER et al., 2009). A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, os quais são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, modificando a absorção de metabólitos e inibindo o crescimento dos explantes (ANDRADE et al., 2000).

Tabela 3 - Porcentagem de calo (C%), de calos com a formação de brotações por morfogênese indireta (CBR%) e de oxidação (O%) em microcepa de grápia mantidas em diferentes meios de cultura com 8,8 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP) e suplementados ou não com carvão ativado (g/L^{-1}) e avaliados durante três coletas sucessivas.

Tratamentos	C (%)	CBR (%)	O (%)
Meio de cultura			
WPM	48,1 b*	26,8 a	35,4 a
MS	48,3 b	29,4 a	29,8 a
½ MS	52,4 a	32,2 a	35,5 a
Carvão ativado			
0	97,6 a	58,4 a	67,1 a
1,5	1,6 b	0,8 b	0,0 b
Coletas			
1º (30 dias)	48,8 a	9,2 c	12,4 c
2º (60 dias)	50,0 a	32,2 b	38,3 b
3º (90 dias)	50,0 a	46,9 a	50,0 a
Média	49,6	29,4	33,6
CV (%)	12,9	48,6	37,8

*Valores seguidos de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro.

Até a terceira coleta não foi verificado efeito inibidor da oxidação, pois nos tratamentos sem uso de carvão ativado houve oxidação assim como a formação de calos e brotos. Entretanto, após a terceira avaliação, as brotações formadas nos calos das raízes das microcepas apresentaram clorose severa, seguido da estagnação do crescimento e morte, sugerindo a necessidade de estudos que visem identificar a condição ideal para a manutenção *in vitro* dos calos e o adequado desenvolvimento dos brotos, para a produção de mudas de grápia via organogênese indireta. É possível que a transferência dos calos após 90 dias para meio de cultura suplementado com carvão ativado possa prolongar o período de cultivo, pois a adição deste composto é justificada em espécies lenhosas, as quais apresentam estabelecimento e crescimento *in vitro* dificultados ou limitados pelas substâncias fenólicas e taninos eliminados pelo explante (OLIVEIRA et al., 2013).

De acordo com os resultados deste trabalho, fica claro que a manutenção de microcepas por 30 dias em meio de cultura acrescido de 8,8 µM de BAP, com posterior subcultivo em meio de cultura isento de citocinina, favorece a indução de brotos nas microcepas de grápia. Além disso, as microcepas mantidas em meio de cultura ½ MS apresentam maior formação de brotações e de calo no sistema radicular, enquanto o WPM favorece o alongamento dos brotos. O uso do carvão ativado também favorece o alongamento dos brotos e o número de microestacas por broto e por microcepa, enquanto o meio de cultura sem suplementação de carvão ativado favorece a formação de calos e de brotações via organogênese indireta. As coletas sucessivas favorecem a formação dos brotos, entretanto resulta em redução do crescimento e da taxa de multiplicação.

Além disso, é muito importante ressaltar que o explante utilizado neste trabalho, denominado microcepa, seria eliminado durante o processo convencional de multiplicação *in vitro* e que apresenta potencial de fornecimento de explantes no mínimo por três coletas. Considerando o número de microestacas por microcepa, a manutenção *in vitro* de microcepas de grápia possibilita a obtenção de cerca de seis explantes por coleta, totalizando até 18 explantes por microcepa ao final das três coletas (90 dias), ao passo que, cada planta de grápia estabelecida *in vitro* forneceria em média apenas 1,8 explantes para a multiplicação, aos 30 dias de cultivo (LENCINA et al., 2014). Esses dados são superiores aos encontrados por Fick em microcepas de *C. trichotoma*, obtendo sete explantes aos 70 dias, o que corresponde a um aumento da taxa de multiplicação em até 1,75 vezes, quando comparado ao número de explantes fornecidos pela plântula (quatro) (FICK, 2007). Sendo assim, a manutenção das microcepas *in vitro* aumenta a taxa de multiplicação em 10 vezes, demonstrando claramente seu potencial de utilização na micropropagação de grápia, pelo fornecimento de explantes que serão empregados no enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, assim como para a conservação de germoplasma. Estudos relacionados à avaliação da capacidade de produção das microcepas, do número de subcultivos, e da capacidade morfogenética indireta dessa espécie são relevantes, tanto para a conservação quanto para a multiplicação *in vitro* de grápia.

3.4 CONCLUSÕES

A indução e o crescimento de brotos nas microcepas de grápia são favorecidos nos cultivos em meio de cultura WPM ou ½ MS acrescido de 8,8 µM de BAP, com posterior

subcultivo para meio de cultura isento de citocinina. A suplementação do meio de cultura com 1,5 g L^{-1} de carvão favorece a produção de microestacas por microcepa. O meio de cultura sem adição de carvão ativado promove a produção de calos e de brotos via organogênese indireta. A manutenção de microcepas *in vitro* maximiza a taxa de multiplicação da grápia, constituindo-se de metodologia promissora para a produção de mudas por microestaquia.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação de aroeira (*Myracrodrun urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa. 2007. p. 93-121.

BARBOZA et al. Efeito de diferentes meios nutritivos e fitorreguladores visando à otimização da calogênese de Annona mucosa (Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.16, n.4, p.905-911, 2014.

BACKES, P.; IRGANG, B. 2004. **Mata Atlântica. As árvores e a paisagem**. Porto Alegre, Paisagem do Sul. 396p.

BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, nov./dez., 2010.

BISOGNIN, D. A. Breeding vegetatively propagated horticultural crops. Croop Breeding and Applied Biotechnology, p. 35-43, 2011.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 6 ed. Viçosa, Ed: UFV, 523 p. 2013.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1, 1039 p.

CNCFLORA. Centro Nacional de Conservação da Flora. Lista Vermelha. Disponível em: http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Dalbergia%20nigra. Acesso em: dez. 2015.

COUTO, M. et al. Multiplicação in vitro dos porta-enxertos de *Prunus* sp. ‘Barrier’ e ‘Cadaman’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 1, p. 5-7, Abril 2004.

DE MARCO, R.; CONTE, B.; BALDIN, T.; PERTUZATTI, A.; CANTARELLI, E. B. Eficiência de diferentes métodos na superação da dormência de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n.14; p. 2012.

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

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

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.3, p.292-299, 2009.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n.1, p.1-7, 2007.

FICK, T. A. **Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (Louro-pardo)**. 2007. 61 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

FILIPPI, M.; et al. Fenologia, morfologia e análise de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 477-491, jul.-set., 2012.

FRANZIN, S. M. et al. Obtenção de brotações aéreas in vitro de *Rollinia salicifolia* (Schelcht). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 131-133, jan-mar, 2004.

GOMES, G. A. C.; PAIVA, R. HERRERA, R. C.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. **Revista Árvore**, Viçosa, v.34, n.1, p.25-30, 2010.

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

GUTIÉRREZ, I. E. M. de; NEPOMUCENO, C. F.; LEDO, C. A. da S.; SANTANA, J. R. F. de. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.2, p.260-265, fev, 2011.

HARTMANN, H. T; KESTER, D. E; DAVIES JR, F. T; GENEVE, R. L. **Plant propagacion**: principles and practices. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915 p.

HEBERLE, M. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel)**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

HENICKA, G. S.; BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; CARVALHO, M. A. C. Germinação de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel.) J.F. Macbr.: temperatura, fotoblastismo e estresse salino. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v.4, n.1, p.37-46, 2006.

HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae).** 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

KLEIN, R. M. Árvores Nativas da Floresta Subtropical do Alto Uruguai. **Sellowia**, Itajaí, v.24, p. 9–62, 1972.

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

LENCINA, K. H. Germinação e multiplicação in vitro de grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.). Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 91 p. 2013.

LENCINA, K. H.; et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grápia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.6, p.1025-1030, jun, 2014.

LIMA, J. D.; MORAES, W. da S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.36, n.1, p.13-19, 2006.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed., v.1, Nova Odessa: Plantarum, 2008. 384p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Phisiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de métodos de escarificação na superação da dormência de sementes e de substratos na germinação e no desenvolvimento da grápia (*Apuleia leiocarpa*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 419-424, 1997.

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

PINTOS, B. et al. Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of Medicago arborea L. **Plant Science**, v.163, n.1, p.955-960, 2002.

RIBEIRO, J. M. et al. Micropropagação de Goiabeira, Maracujazeiro, Bananeira e Videira. **Circular técnica Embrapa**. 2012

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacarandá da bahia. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SINGH, N.D. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (Cajanus cajan L. Millsp). Plant Science, v.164, n.1, p.341-347, 2003.

SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**. v.31, n. 4, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia **Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

VIEITEZ, A. M.; CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; MUNOZ, F.; DURÁN, J.; IBARRA, M. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherland, v.98, n.2, p.135-145, 2009.

WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, KAMILA, V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

XAVIER, A; SILVA, R. L. da. Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, San José, v. 34, n. 1, p. 93-98, 2010.

4 CAPITULO II

RESUMO

ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE GRÁPIA

AUTORA: Kelen Haygert Lencina
ORIENTADOR: Dilson Antônio Bisognin

O objetivo deste trabalho foi avaliar o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de grápia (*Apuleia leiocarpa*) e a aclimatização de plantas micropropagadas. No enraizamento *in vitro*, segmentos nodais e microestacas foram cultivadas em meio de cultura WPM com 0, 4,9, 9,8, 14,7 e 19,6 µM de ácido indolbutírico (AIB). Na aclimatização das plantas foram testadas as composições de substrato comercial + vermiculita + areia grossa e substrato comercial + vermiculita, em iguais proporções. Para o enraizamento *ex vitro*, segmentos nodais e microestacas foram tratados ou não com 4920 µM de AIB por 10 segundos e cultivados em iguais proporções de substrato comercial + vermiculita + areia grossa, substrato comercial + vermiculita e substrato comercial + areia grossa. Segmentos nodais apresentaram maior enraizamento *in vitro* do que microestacas, sem a necessidade da suplementação do meio de cultura com AIB. A composição do substrato não afetou a sobrevivência e o crescimento das plantas produzidas *in vitro* durante a aclimatização. As melhores respostas de enraizamento *ex vitro* ocorreram em segmentos nodais, assim como no explantes tratados com 4920 µM de AIB e cultivados em substrato comercial + vermiculita + areia grossa. O enraizamento *ex vitro* pode ser utilizado para a produção de mudas de grápia, apesar de ajustes nas condições de cultivo serem necessários, visando ao aumento da sobrevivência das plantas micropropagadas.

Palavras-chave: *Apuleia leiocarpa*. Micropropagação. Microestacas. Ácido indolbutírico. Composição de substrato.

ABSTRACT

ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF APULEIA PLANTLETS

AUTHOR: Kelen Haygert Lencina
ADVISOR: Dilson Antônio Bisognin

This work aimed to evaluate *in vitro* and *ex vitro* rooting of *Apuleia leiocarpa* and acclimatization of micropropagated plantlets. For *in vitro* rooting, nodal segments and micro-cuttings were grown in WPM culture medium with 0; 4.9; 9.8; 14.7 and 19.6 µM indolebutyric acid. For acclimatization, the compositions of commercial substrate + vermiculite + coarse sand and commercial substrate + vermiculite, in equal proportions, were tested. For *ex vitro* rooting, nodal segments and micro-cuttings were treated, or not, with 4,920 µM indolebutyric acid for 10 seconds and grown in equal proportions of: commercial substrate + vermiculite + coarse sand; commercial substrate + vermiculite and commercial substrate + coarse sand. Nodal segments presented greater rooting *in vitro* than micro-cuttings without need for indolebutyric acid supplementation in the culture medium. Substrate composition did not affect survival or growth *in vitro* during acclimatization. The best rooting *ex vitro* was found in nodal segments and explants treated with 4,920 µM indolebutyric acid and grown in commercial substrate + vermiculite + coarse sand. *Ex vitro* rooting is a promising technique for producing apuleia plantlets, despite the necessity for adjustments to environmental conditions, and may contribute to increased survival of micropropagated plantlets.

Key word: *Apuleia leiocarpa*. Micropropagation. Micro-cuttings. Indolebutyric acid. Substrate composition.

4.1 INTRODUÇÃO

A grápia é uma espécie arbórea da família Fabaceae nativa da Mata Atlântica e de ampla distribuição no Brasil, sendo observada desde a região Sul até Norte e Nordeste. Essa espécie também ocorre naturalmente desde o Peru (BACKES; IRGANG, 2004) até o Uruguai (SOBRAL et al., 2006). Além de fornecer madeira de excelente qualidade, é espécie pioneira em vegetação secundária, colaborando eficientemente no desenvolvimento da vocação florestal dessas áreas (BACKES; IRGANG, 2004). Em consequência da grande exploração de grápia em busca de madeira para uso em estruturas externas, construção civil, marcenaria, entre outros fins (CARVALHO, 2003), essa espécie encontra-se criticamente ameaçada de extinção (RIO GRANDE DO SUL, 2014).

A produção de mudas de grápia é limitada por características inerentes à planta, como frutificação irregular ao longo dos anos e sementes com tegumento impermeável à água, o que dificulta a germinação (CARVALHO, 2003). Assim, estudos que envolvam a identificação de tecnologias alternativas de produção de mudas de grápia são relevantes, podendo a micropropagação ser uma opção, já que essa técnica possui aplicações comprovadas na multiplicação de diversas espécies vegetais (ERIG; SCHUCH, 2005). Para a grápia, os estudos relacionados à propagação vegetativa são restritos e abordam o estabelecimento *in vitro* de plantas assépticas para fornecimento de propágulos para a multiplicação *in vitro*, assim como informações iniciais quanto a manutenção *in vitro* dessas plantas assépticas como microcepas (LENCINA, 2013; LENCINA et al., 2014).

Na micropropagação, brotos adventícios produzidos na etapa de multiplicação podem ser enraizados *in vitro* ou *ex vitro*, entretanto a capacidade dos tecidos para a formação de raízes depende de vários fatores endógenos e/ou exógenos e suas interações (ROCHA et al., 2008). Os tipos de explantes utilizados no enraizamento adventício influenciam as respostas das plantas à micropropagação, sendo a sua seleção realizada buscando o propágulo vegetativo que possa apresentar melhores respostas ao cultivo *in vitro* (XAVIER et al., 2013).

O enraizamento *in vitro* caracteriza-se pela indução de raízes adventícias em brotos alongados, geralmente mantidos em meio de cultura suplementado com auxinas, visando à obtenção de plantas completas que serão posteriormente aclimatizadas (OLIVEIRA et al., 2013). Já no enraizamento *ex vitro*, os explantes são tratados ou não com auxinas e plantados em substrato para a formação de raízes concomitante à aclimatização. O grupo das auxinas é composto por diversas substâncias com atividade reguladoras de crescimento, dentre as quais se destaca o ácido indolbutírico (AIB), o qual tem apresentado maior eficácia na promoção de raízes adventícias em propágulos de espécies florestais (XAVIER et al., 2013). Até o presente momento não há informações quando ao enraizamento adventício de propágulos de grápia.

A aclimatização é um dos processos indispensáveis para a obtenção de novas plantas (WENDLING et al., 2006) e consiste na transferência de plantas completas, produzidas *in vitro*, para o ambiente externo, devendo ser realizada de forma gradativa e cuidadosa. A aclimatização é uma etapa limitante para a maior parte das espécies micropropagadas, devido à alta taxa de mortalidade. Esse processo depende da habilidade da planta de passar da condição heterotrófica para a autotrófica, dos fatores abióticos (umidade relativa, temperatura,

luminosidade, substratos, entre outros), dos fatores bióticos (pragas e doenças), e da presença ou capacidade das plantas de produzir novas raízes (PAIVA; OLIVEIRA, 2006).

Para minimizar o estresse dessa etapa e maximizar a sobrevivência das plantas durante a aclimatização, a manutenção da umidade relativa do ar, a escolha adequada do substrato e o controle da temperatura e luminosidade são fatores que influenciam a sobrevivência e o crescimento das plantas micropropagadas (OLIVEIRA et al., 2013). O substrato utilizado durante a aclimatização deve apresentar características adequadas de espaço de aeração, associado à alta capacidade de retenção de água (GIRARDI; PESCADOR, 2010), sendo a escolha do tipo de substrato e a definição da proporção de mistura fatores determinantes na aclimatização de plantas micropropagadas (SKREBSKY et al., 2006).

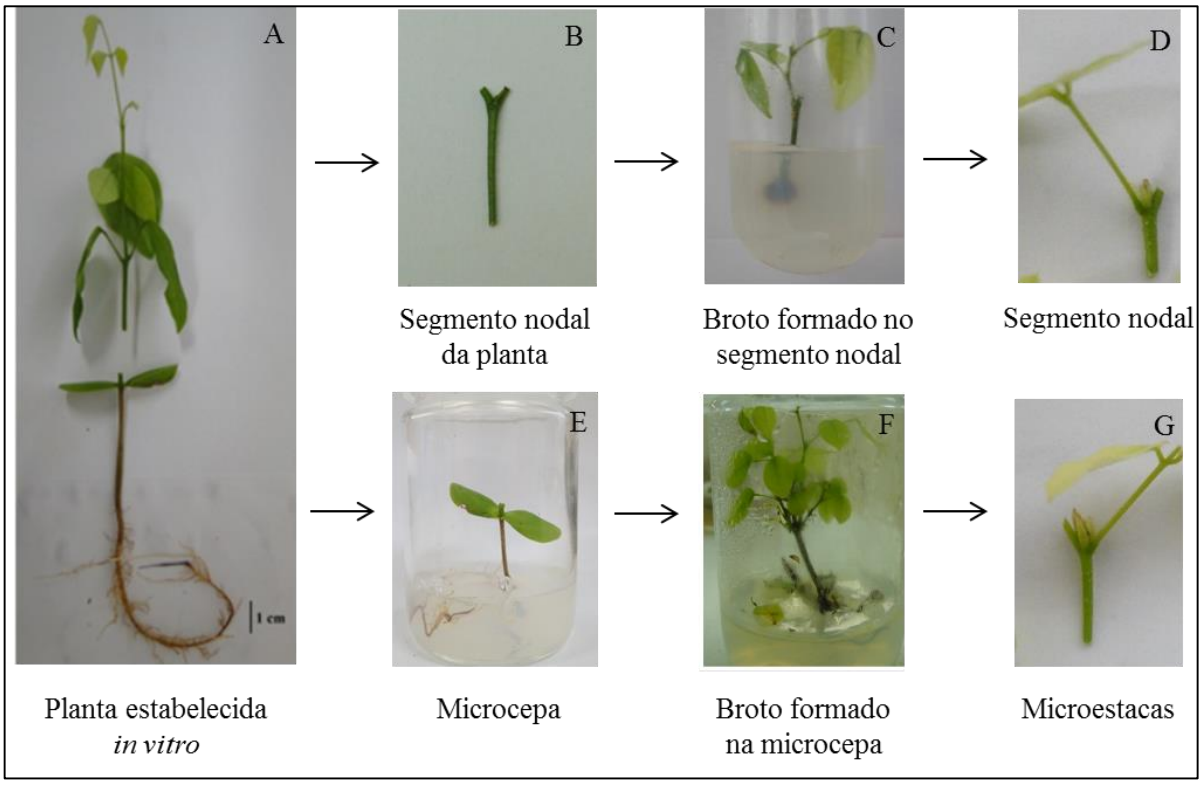
A hipótese deste estudo é que os tipos de explantes, as concentrações de AIB e as composições de substrato influenciam o processo rizogênico e a aclimatização. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito desses fatores no enraizamento *in vitro* e *ex vitro* e na aclimatização de plantas micropropagadas de grápia.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos durante os meses de setembro de 2012 a fevereiro de 2013, no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (MPVP), Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. Nos experimentos utilizando substrato, uma amostra de cada composição foi encaminhada para análise física, conforme metodologia descrita na Instrução Normativa nº 14 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo obtidos os valores de densidade seca, espaço de aeração e capacidade de retenção de água sob sucção de 10 cm de coluna de água.

Para obtenção dos explantes, plântulas assépticas foram estabelecidas em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) por 15 dias (Figura 4 A) conforme metodologia descrita por Lencina et al., (2014). As sementes utilizadas nesse estudo foram coletadas em três árvores matrizes localizadas no município de Ijuí, RS.

Figura 4 – Etapas para a obtenção dos segmentos nodais e das microestacas utilizados no enraizamento de grápia.



A parte aérea da planta foi seccionada em segmentos nodais (Figura 4 B), os quais foram mantidos por 30 dias em meio de cultura WPM suplementado com 8,8 µM de BAP, seguido da transferência para meio de cultura isento de BAP, onde permaneceram por mais 30 dias. Os brotos formados ao término desse período (Figura 4 C) foram novamente seccionados em segmentos nodais de gema única, os quais foram utilizados neste estudo para o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* (Figura 4 D). O sistema radicular e o restante da parte aérea das plantas assépticas, denominadas de microcepas, foram mantidas em meio de cultura WPM suplementado com 8,8 µM de BAP por 30 dias e, posteriormente, transferidas para meio de cultura isento de BAP onde permaneceram por mais 30 dias (Figura 4 E). Os brotos formados nas microcepas (Figura 4 F) foram seccionados em microestacas de gema única, que também foram utilizadas nos experimentos de enraizamento *in vitro* e *ex vitro* (Figura 4 G). Assim, os tipos de explantes diferiram quanto a sua origem. Segmentos nodais foram produzidos a partir de segmentos oriundos da parte aérea de plantas assépticas, enquanto que as microestacas foram produzidas a partir de microcepas.

4.2.1 Enraizamento *in vitro* e aclimatização

Para o enraizamento *in vitro*, segmentos nodais e microestacas de gema única, com 1,0 a 1,5 cm de comprimento, foram cultivados em tubos de ensaio (50 mL) contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura WPM suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, 6 g L^{-1} de ágar, 0,1 g L^{-1} de inositol e 1,5 g L^{-1} de carvão ativado. Os meios de cultivo foram esterilizados por autoclavagem durante 20 min. à temperatura de 121 ºC e pressão de 1 atm. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, e os cultivos mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 ºC e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de 14,3 µE m^{-2} S^{-1} fornecida por lâmpadas fluorescentes. Foram testadas as concentrações de 0, 4,9, 9,8, 14,7 e 19,6 µM de ácido indolbutírico (AIB). O experimento foi um fatorial 2 x 5, consistindo em dois tipo de explante e cinco concentração de AIB, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro explantes, totalizando 20 explantes por tratamento. A porcentagem de sobrevivência e de enraizamento, o número e o comprimento total das raízes (cm) foram avaliados aos 60 dias de cultivo.

Para a aclimatização, os explantes enraizados *in vitro* foram retirados dos tubos de ensaio e, após lavagem das raízes em água corrente procedeu-se a transferência, individualmente, para potes plásticos com furos para dreno (330 mL) com, aproximadamente, 110 g de substrato previamente esterilizado em autoclave por 1 h. Foram testadas iguais proporções de substrato comercial + vermiculita + areia grossa, e substrato comercial + vermiculita. Em todos os tratamentos foi empregado substrato comercial à base de casca de pinus (H. DECKER®), vermiculita de granulometria fina (partículas entre 0,3 e 0,5 mm de diâmetro) e areia grossa (partículas entre 1 e 3 mm de diâmetro). Os potes foram mantidos na sala de crescimento em bandejas de polietileno (55 x 34 x 15 cm) cobertas com filme de PVC transparente durante sete dias e a posterior transferência para casa de vegetação climatizada. Para a manutenção da umidade do substrato foi realizada uma irrigação diária com água destilada. Uma vez por semana foi feita a irrigação com solução nutritiva contendo os macronutrientes em mmol: 0,61 de nitrato de potássio; 1,0 de nitrato de cálcio; 1,67 de sulfato de magnésio; 0,14 de nitrato de amônio; 0,14 de monofosfato de potássio e 0,16 de ferro quelatizado 5%. Os micronutrientes foram adicionados à solução nutritiva em mistura previamente preparada contendo em mmol: 0,015 de molibdato de sódio, 0,089 de ácido bórico; 0,125 de sulfato de cobre; 0,123 de sulfato manganês e 0,028 de sulfato de zinco. O

delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com oito repetições de quatro potes com uma planta, totalizando 32 plantas por tratamento. Aos 30 dias de cultivo foram avaliados a porcentagem de sobrevivência das plantas, a altura da parte aérea (cm) e o número de folhas.

4.2.2 Enraizamento *ex vitro* e aclimatização

Segmentos nodais e microestacas de gema única (Figura 1), com 1,0 a 1,5 cm de comprimento, excisados de brotações produzidas durante a etapa de multiplicação *in vitro*, tiveram suas bases imersas em solução com ou sem 4920 µM de AIB, por 10 segundos, e cultivados em potes plásticos com furos para dreno (50 mL) com, aproximadamente, 20 g de substrato previamente esterilizado em autoclave por 1 h. Foram testadas iguais proporções das composições de substrato comercial + vermiculita + areia grossa, substrato comercial + vermiculita, e substrato comercial + areia grossa. Foi utilizado substrato comercial à base de pinus e vermiculita de granulometria média. Os potes permaneceram em bandejas cobertas com filme de PVC transparente por sete dias, mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 ºC e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de 14,3 µE m^{-2} S^{-1} fornecida por lâmpadas fluorescentes. A umidade do substrato foi mantida por meio de duas irrigações diárias com água destilada. Após, os cultivos foram transferidos para câmara úmida em casa de vegetação climatizada, onde permaneceram por 45 dias. O experimento foi um fatorial 2 x 2 x 3 (tipo de explante, concentração de AIB e composição do substrato), em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de cinco potes contendo um explante. Aos 7, 15, 30, e 45 dias em câmara úmida foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência e de enraizamento dos explantes, o número e comprimento (cm) das raízes.

Os dados de porcentagem foram transformados para arcoseno $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, com o auxílio dos programas ESTAT (Unesp - Jaboticabal).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Enraizamento *in vitro* e aclimatização

No enraizamento *in vitro*, aos 60 dias de cultivo não houve interação entre o tipo de explante e a concentração de AIB para todas as variáveis analisadas. Para as porcentagens de sobrevivência e de enraizamento e o comprimento das raízes, foi observada diferença entre o tipo de explante, com melhores respostas em segmentos nodais (97,5% de sobrevivência, 28,9% de enraizamento e raízes com média de 6,2 cm de comprimento) se comparados às microestacas (Tabela 4). Tanto segmentos nodais quanto microestacas são formados a partir de órgãos meristemáticos pré-formados (gemas axilares), os quais, geralmente, apresentam satisfatório crescimento e uniformidade (WATT, 2003). Acredita-se que as diferenças de respostas entre os tipos de explante não se deva a diferenças de competência morfogênicas entre os mesmos, visto serem constituídos pelo mesmo material genético, mas sim, por apresentarem diferenciada concentração de fitohormônios.

Considerando que a síntese de auxina se dá no ápice das plantas e tem movimento unidirecional pelas células parenquimáticas do tecido vascular, se direcionando aos ápices radiculares (TAIZ; ZEIGER, 2013), é possível que a maior aptidão ao enraizamento de segmentos nodais de grápia se relacione com a maior quantidade de auxina endógena se comparado às microestacas. A auxina endógena promove a ativação de genes responsáveis pela formação precoce do primórdio radicular. Além disso, quando conjugado com aminoácidos que promove a síntese de proteínas específicas necessárias para a formação de raízes iniciais, sendo que tal processo favorecido pela aplicação de auxinas exógena (GASPAR; HOFINGER, 1988; ONO; RODRIGUES, 1996). Essa possivelmente corresponde a explicação das diferenças de respostas entre os diferentes explantes, visto que outros fatores que interferem nas respostas de enraizamento adventício não diferiram, como idade ontogenética, genótipo, meio de cultura, carboidratos, nutrição mineral e condições ambientais, assim como as concetrações de AIB exógeno.

Mesmo os tipos de explante terem apresentado diferença de enraizamento, ambos formaram raízes, indicando a necessidade de outros estudos voltados à minimização dessas diferenças e identificação de condições que favoreçam o enraizamento. Não se pode deixar de mencionar que o desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condição *in vitro* ou *in vivo*, é um processo de grande complexidade envolvendo fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados (SOUZA; PEREIRA, 2007). Segundo Oliveira et al. (2013) a maior parte dos trabalhos publicados de micropropagação das espécies florestais brasileiras se

restringem ao estabelecimento e a multiplicação *in vitro*, e raramente o enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas, o que ratifica a relevância das informações obtidas no presente trabalho.

Tabela 4 - Porcentagem de sobrevivência e de enraizamento *in vitro*, número e comprimento das raízes formadas em segmentos nodais e microestacas de grápia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento das raízes (cm)
Tipo de explante				
Segmento nodal	97,5 a[1]	28,9 a	1,8 a	6,2 a
Microestaca	92,3 b	11,8 b	1,8 a	2,8 b
AIB (µM)				
0	96,1 a	20,3 a	1,9 a	6,3 a
4,9	96,6 a	14,3 a	2,4 a	4,1 ab
9,8	92,5 a	26,4 a	1,5 a	5,5 a
14,7	94,1 a	21,5 a	1,4 a	3,0 b
19,6	93,7 a	19,2 a	1,8 a	3,9 ab
Média	94,6	20,3	1,8	4,5
CV (%)	12,9	74,5	21,3	26,6

[1]Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As concentrações de AIB não afetaram as variáveis analisadas, exceto o comprimento das raízes que foram observadas as melhores respostas em explantes cultivados em meio de cultura isento de AIB ou acrescido de 9,8 µM de AIB (Tabela 4). O fato das concentrações de AIB não ter influenciado a porcentagem de enraizamento e o número de raízes, assim como o maior comprimento poder ser obtido na ausência de AIB, corrobora com a possibilidade dos explantes utilizados apresentarem concentração endógena de auxina suficiente para a indução rizogênica, além da aptidão natural da espécie em desenvolver raízes. Sabe-se que, em estudo de cultivo *in vitro*, quando as doses de auxina são superiores às de citocinina, a resposta morfogenética está associada à formação de raízes (SKOOG; MILLER, 1957).

Na aclimatização das plantas de grápia produzidas *in vitro*, as composições de substrato testadas não afetaram a sobrevivência, a altura da parte aérea e o número de folhas, sendo observada média de 73,4% de plantas vivas aos 30 dias de cultivo (Tabela 5). Essa sobrevivência é próxima à observada na aclimatização de plantas micropropagadas de *Cydonia oblonga* Mill. (81,8%) quando utilizado um substrato de composição semelhante a um dos tratamentos substrato comercial e vermiculita (v/v 1:1), aos 30 dias de cultivo (ERIG et al., 2004). Também aos 30 dias de aclimatização em substrato comercial e vermiculita (v/v 1:1), Nicioli et al. (2008) observaram 41% de sobrevivência de plantas de *Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville provenientes do enraizamento *in vitro*.

Tabela 5 – Porcentagem de sobrevivência, altura da parte aérea (cm) e número de folhas em plantas de grápia enraizadas *in vitro* e aclimatizadas por 30 dias em sala de crescimento.

Substrato[1]	Sobrevivência (%)	Altura da parte aérea (cm)	Número de folhas
SC + V + A	62,5 a[2]	1,2 a	2,0 a
SC + V	84,4 a	1,2 a	3,1 a
Média	73,4	1,2	2,5
CV (%)	30,1	15,1	42,2

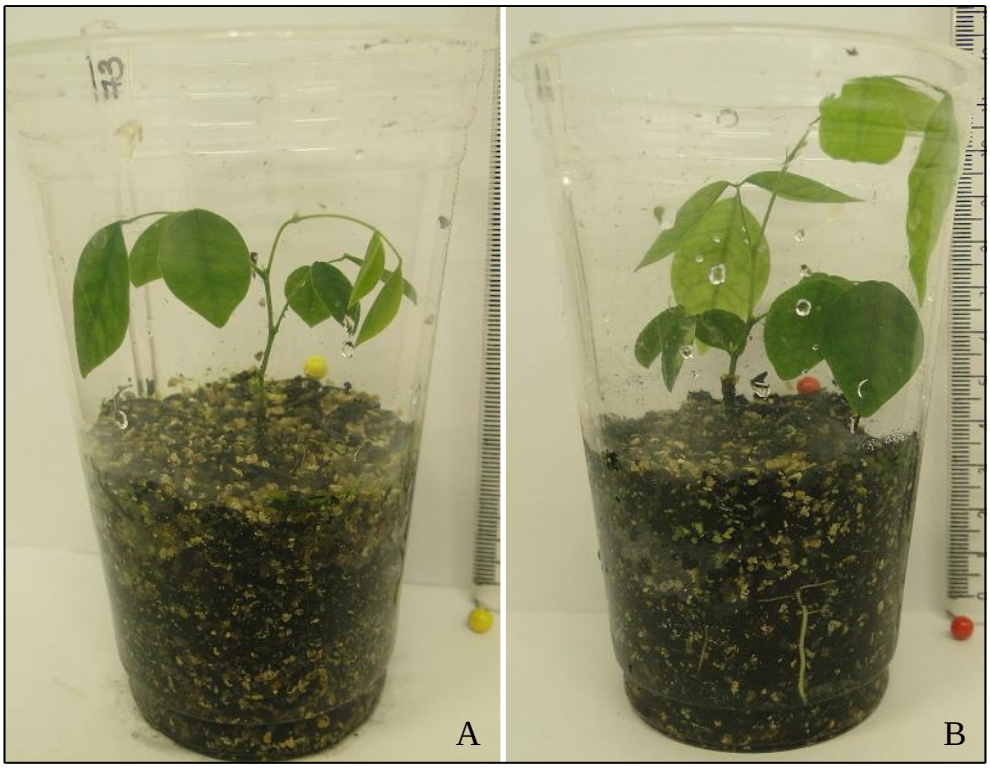
[1]Mesmas proporções (v/v) de substrato comercial (SC), vermiculita (V) e areia grossa (A) nas respectivas combinações. [2]Valores seguidos de mesma letra não diferem-se pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Neste estudo, é possível que as condições oferecidas na aclimatização tenham sido adequadas durante a passagem do estado heterotrófico para o autotrófico, o que favoreceu a sobrevivência das plantas. Os substratos testados apresentaram densidade seca de 277 e 770,7 kg m^{-3}, do espaço de aeração de 19,9 a 25,3% e a capacidade de retenção de água de 38,7 a 57,2% (Tabela 7). Esses valores provavelmente correspondem a faixa adequada para desenvolvimento das plantas de grápia devido a favorável condição de aeração associada à maior capacidade de retenção de água dessas composições de substrato.

Acredita-se que maiores porcentagens de sobrevivência poderiam ser obtidas se realizados tratamentos prévios nas plantas micropropagadas. Uma etapa fotoautotrófica poderia ser uma opção para maximizar as taxas de sobrevivência, visto que a planta torna-se

autotrófica antes da retirada do meio de cultura e transferência para condições externas. O crescimento fotoautotrófico pode aumentar a capacidade fotossintética usando um nível elevado de dióxido de carbono (CO_2) na fase gasosa da cultura, um maior fluxo de fótons, e uma redução concomitante nos hidratos de carbono fornecidos pelo meio de cultura (YOHANNES et al., 2014). Esta estratégia foi relatada como benéfica para várias características morfológica e fisiológicas, como produção de raízes, comprimento da parte área, área foliar, massa fresca e seca de mudas, teor de clorofila e densidade estomática (APEL, 1989; KIRDMANEE et al., 1995; ZOBAYED et al., 2000; NGUYEN et al., 2001; TANAKA et al., 2005).

Figura 5 – Plantas micropropagadas de grápia após 30 dias de aclimatização em duas composições de substrato. Substrato comercial (SC) + vermiculita (V) + areia grossa (A) e substrato comercial + vermiculita (B).



4.3.2 Enraizamento *ex vitro* e aclimatização

Houve a formação de raízes das plantas somente aos 30 dias de cultivo, porém, não foi verificada diferença entre os tipos de explante, a concentração de AIB e as composições de substrato para todas as variáveis analisadas. Aos 45 dias de avaliação, a sobrevivência das

plantas foi influenciada apenas pelo tipo de explante, sendo observada melhor resposta em segmentos nodais se comparados às microestacas (Tabela 6).

Para o enraizamento houve influencia do tipo de explante, com respostas superiores dos segmentos nodais (14,6% de enraizamento), assim como da concentração de AIB e do tipo de substrato, com melhores respostas quando tratados com AIB (12% de explantes enraizados) ou nos cultivos em substrato comercial + vermiculita + areia grossa (14% de explantes enraizados) (Tabela 6). Estes resultados indicam que os segmentos nodais são mais responsivos também ao enraizamento *ex vitro* se comparados às microestacas. Além disso, para o enraizamento *ex vitro* de grápia o uso de AIB é necessário, diferentemente do enraizamento *in vitro*. As respostas de enraizamento são inferiores às obtidas em brotos obtidos da multiplicação *in vitro* de *Tectona grandis* L. tratados com a mesma concentração de AIB (4920 µM) e mantidos em substrato comercial ou vermiculita, nos quais foi observado 100% de enraizamento *ex vitro*, aos 30 dias de cultivo. Já os brotos de *T. grandis* quando não tratados com AIB, apresentaram 85% de enraizamento nos cultivos em vermiculita e 95% de enraizamento em substrato comercial (FERMINO JÚNIOR et al., 2011).

As auxinas são essenciais nas etapas de indução e iniciação dos primórdios radiculares, podendo ser prejudicial na última etapa, a elongação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Além de afetar a rizogênese, concentrações excessivas de auxina podem ser tóxicas à planta, afetando também o crescimento da parte aérea (PASQUAL et al., 2001). Entretanto, o efeito fitotóxico da auxina não foi evidenciado tanto no enraizamento *in vitro*, quanto *ex vitro*. Nesse caso, a maior média de enraizamento observada *in vitro* possivelmente tenha relação com o maior controle das condições de cultivo a ambientais quando comparado ao enraizamento *ex vitro*. Além disso, acredita-se que a grápia trata-se de uma espécie recalcitrante ao enraizamento adventício.

Para o número e comprimento das raízes, houve efeito negativo do tratamento com AIB e da composição do substrato, aos 45 dias de cultivo (Tabela 6). O maior número e comprimento das raízes foram obtidos nos cultivos não tratados com AIB e mantidos em substrato comercial + vermiculita + areia e substrato comercial + vermiculita. Conforme a análise física (Tabela 7) nas composições substrato comercial + vermiculita + areia e substrato comercial + areia foram observados valores superiores de DS quando comparados aos valores de referência entre 400 e 500 kg m^{-3} (BUNT, 1973). Este resultado pode ser explicado pela presença de areia nessas misturas, já que este componente apresenta alta

densidade. Tais composições de substrato também apresentaram adequados valores de espaço de aeração, já que a faixa considerada ótima se encontra entre 20 e 40% (DE BOODT; VERDONCK, 1972). Para produção de mudas de *Sesbania virgata* Cav. Pers, EA de até 25% aumentaram a produção de raízes nos mudas, após 150 dias em casa de sombra (DELARMELINA et al., 2014).

Tabela 6 – Porcentagem de sobrevivência e enraizamento *ex vitro*, número e comprimento das raízes formadas em de segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento das raízes (cm)
Tipo de explante				
Segmento nodal	33,3 a[2]	14,6 a	1,1 a	1,3 a
Microestaca	14,0 b	3,3 b	1,3 a	0,9 a
AIB (µM)				
0	22,6 a	6,6 b	1,6 a	1,4 a
4920	24,6 a	12,0 a	0,9 b	0,8 b
Substratos[1]				
SC + V + A	21,0 a	14,0 a	1,7 a	1,5 a
SC + V	23,0 a	9,0 b	1,0 ab	1,3 a
SC + A	27,0 a	4,0 b	1,0 b	0,6 b
Média	23,6	9,0	1,2	1,1
CV (%)	48,6	77,9	14,0	22,1

[1]Mesmas proporções (v/v) de substrato comercial (SC), vermiculita (V) e areia grossa (A) nas respectivas combinações. [2]Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Com relação à CRA, foram observados maiores valores nas composições substrato comercial + vermiculita + areia e substrato comercial + vermiculita, o que pode estar relacionado à menor proporção de areia nessas composições se comparadas com a mistura substrato comercial + areia. Assim, o maior enraizamento dos explantes de grápia nos cultivos em substrato comercial + vermiculita + areia (Tabela 6) pode ser explicado pela favorável

condição de aeração associada à maior capacidade de retenção de água dessa composição de substrato.

Tabela 7 - Características físicas da composição dos substratos utilizados para aclimatização das plantas micropropagadas e enraizamento *ex vitro* de explantes de grápia.

Composição dos substratos[1]	DS[2] (kg m^{-3})	EA (%)	CRA 10 (%)
SC + V + A	770,7	25,3	38,7
SC + V	277,8	19,9	57,2
SC + A	997,1	29,6	30,9

[1] SC + V + A = substrato comercial + vermiculita+ areia grossa (1:1 v/v); SC + V = substrato comercial + vermiculita (1:1 v/v); SC + A = substrato comercial + areia grossa (1:1 v/v).
[2] DS= densidade seca; PT= porosidade total; EA=espaço de aeração; CRA 10=capacidade de retenção de água sob sucção de 10 cm de coluna de água; e pH= determinado em água, diluição 1:5 (v/v).

Os resultados deste trabalho mostram que grápia é uma espécie de difícil enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, ao se considerar que as maiores porcentagens de enraizamento foram 28,9% e 14,0% respectivamente. Tanto no enraizamento *in vitro* quanto *ex vitro*, segmentos nodais resultaram em maiores porcentagens de enraizamento se comparados às microestacas. Entretanto, mesmo diante das diferenças estatísticas que indicam superioridade dos segmentos nodais quando comparados às microestacas, ambos os explantes se mostraram competentes ao enraizamento *in vitro*. Além disso, considerando que a manutenção de microcepas pode constituir-se de importante estratégia para aumentar a taxa de multiplicação da grápia, estudos devem ser realizados para minimizar estas diferenças. Com relação ao uso de auxina, foi observado que as concentrações utilizadas de AIB não alteraram a porcentagem de enraizamento *in vitro*, mas favoreceu o enraizamento *ex vitro*. Ajustes são necessários para melhor definir as condições necessárias para o enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas de grápia, considerando a menor sobrevivência das plantas se comparado com os valores observados no enraizamento *in vitro*. Apesar disso, no enraizamento *ex vitro* foi observado que 14% dos explantes enraizaram em substrato comercial + vermiculita + areia, indicando que está técnica é promissora para a produção de plantas de grápia, visto que promove o enraizamento concomitante à aclimatização e reduz os custos de produção das mudas. Aliado a isso, estas plantas podem ser utilizadas em microjardim clonal para a produção de mudas por microestaquia, o que deve viabilizar economicamente a produção massal de mudas de grápia.

4.4 CONCLUSÃO

Não é necessário o uso de AIB para o enraizamento *in vitro* de segmentos nodais e microestacas de grápia, e a aclimatização de plantas micropropagadas não foi influenciada pelas composições de substrato. Para o enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas de grápia, os segmentos nodais podem ser tratados com 4920 µM de AIB e cultivados em substrato comercial + vermiculita + areia grossa.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APEL, P. Influence of CO_2 on stomatal numbers. **Biology of Plant**, v. 31, p.72-74, 1989.

BACKES, P. & IRGANG, B. 2004. **Mata Atlântica. As árvores e a paisagem**. Porto Alegre, Paisagem do Sul. 396p.

BUNT, A.C. Some physical and chemical characteristics of loam less pot-plant substrates and their relation to plant growth. **Plant and Soil**, The Hague, n.38, p.1954-1965, 1973.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1, 1039 p.

DE BOODT, M.; VERDONCK, O. The physical properties of the substrates in horticulture. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 26, p.37-44, 1972.

DELARMELINA, W. M.; CALDEIRA, M. V. W.; FARIA, J. C. T.; GONÇALVES, E. de O.; ROCHA, R. L. F. Diferente substratos para a produção de mudas de *Sesbania virgata*. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 2, p. 224-233, abr./jun. 2014.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. da C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. MC e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.5, n.1-2, p.61-68, 2004.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 961-965, jul-ago. 2005.

FERMINO JÚNIOR, P. C. P.; RAPOSO, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. **Floresta**, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 79-86, jan./mar. 2011.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.117-31.

GIRARDI, C. G.; PESCADOR, R. Aclimatação de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 62-72, 2010.

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

KIRDMANEE, C., KITAYA, Y., KOZAI, T. Effects of CO_2 enrichment and supporting material on growth, photosynthesis and water potential of Eucalyptus shoots/plantlets cultured photoautotrophically *in vitro*. **Environmental Control Biology**, v. 33, p.133–140, 1995.

LENCINA, K. H. **Germinação e multiplicação in vitro de grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.).** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 91 p. 2013.

LENCINA, K. H.; et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grápia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.6, p.1025-1030, jun, 2014.

LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**,v. 30, p. 421-327, 1980.

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T.; HEO, J.; THAI, D. X. Photoautotrophic growth response of in vitro cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 66, p. 217–225, 2001.

NICIOLI, P. M. et al. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p. 685-689, 2008.

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out./dez. 2013.

ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares. Jaboticabal**: FUNEP, 1996. 83p.

PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M. de. **Fisiologia e produção vegetal**. Lavras: UFLA, 2006. 104p.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 165p.

RIO GRANDE DO SUL. Decreto n. 52.109, de 1 de dezembro de 2014. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em:

<http://www.al.rs.gov.br/legis/M010/M0100099.ASP?Hid_Tipo=TEXTO&Hid_TodasNormas=61669&hTexto=&Hid_IDNorma=61669>Acesso em: 29 de junho de 2015.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of the Society of Experimental Biology**, v. 11, p. 118-130, 1957.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANE, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida in vitro sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, 2006.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J.; RODRIGUES, R. S. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul**, Brasil. São Carlos, RiMA/Novo Ambiente. 2006.

SOUZA; A. V.; PEREIRA, A. N. S. Enraizamento de plantas cultivas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. V. 9, n. 4, p. 103-117. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TANAKA, M.; GIANG, D. T. T.; MURAKAMI, A. Application of a novel disposable film culture system to photoautotrophic micropropagation of *Eucalyptus uro-grandis (urophylla x grandis*). **In Vitro Cell Development Biology Plant**, v. 41, p.173–180, 2005.

XAVIER, A.; et al. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

WATT, M. P., BLAKEWAY, F. C., MOKOTEDI, M. E. O., JAIN, S. M. Micropropagation of Eucalyptus. In: JAIN, S. M. ISHII, K. (Eds.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. P.217-244.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas.** Colombo: Embrapa Florestas. 2006. 54 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).

YOHANNES, M. S. ADKINS, S. Improving acclimatization through the photoautotrophic culture of coconut (*Cocos nucifera*) seedlings: an in vitro system for the efficient exchange of germplasm. **In Vitro Cellular Development Biology Plant**, v. 50, p. 493–501, 2014.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Ann Bot**, v. 85, p. 587–592, 2000.

5 CAPITULO III

RESUMO

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Apuleia leiocarpa* COM MARCADORES RAPD

AUTORA: Kelen Haygert Lencina
ORIENTADOR: Dilson Antônio Bisognin

A grápia (*Apuleia leiocarpa*) é uma espécie arbórea nativa que se encontra em risco de extinção. Isso justifica estudar a diversidade e a estrutura genética das populações, para promover estratégias de manejo sustentável, conservação e melhoramento genético. Os marcadores RAPD permitem a análise da estrutura genética de populações e são marcadores acessíveis para espécies arbóreas pouco estudadas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a variabilidade genética, selecionar iniciadores RAPD para o estudo da estrutura genética de populações, e identificar fragmentos com potencial para o sequenciamento de regiões conservadas do genoma da grápia. Reações de RAPD foram preparadas com 18 oligonucleotídeos iniciadores em amostras de DNA extraídas a partir de adaptação do procedimento clássico que emprega o detergente catiônico brometo de cetil trimetil amônia (CTAB). Os fragmentos foram pontuados com ausência (0) ou presença de fragmento (1) gerando uma matriz binária. Foi calculada a contribuição relativa de cada iniciador para o polimorfismo, bem como o polimorfismo total. Também foi calculado o conteúdo de informação para o polimorfismo (PIC) para cada fragmento e por iniciador. A análise de agrupamento foi realizada com base na similaridade de Jaccard e no método UPGMA. Houve boa adequação metodológica, tanto para a extração do DNA quanto para as reações de amplificação PCR-RAPD. O marcador RAPD é eficiente para a análise genética e mostrou a existência de alta variabilidade na grápia. O estudo da variabilidade genética pode ser realizado com 11 iniciadores, sendo que um destes apresenta fragmentos monomórficos, que podem ser utilizados para o sequenciamento e desenho de iniciadores específicos para a grápia.

Palavras-chave: Grápia, polimorfismo, PIC, seleção de iniciadores, análise de agrupamento.

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY OF *Apuleia leiocarpa* WITH RAPD MARKERS

AUTHOR: Kelen Haygert Lencina
ADVISOR: Dilson Antônio Bisognin

Apuleia (*Apuleia leiocarpa*) is a native tree species in severe danger of extinction. This justifies studying the diversity and the genetic structure of the populations to develop sustainable management, conservation and breeding strategies. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers allow the analysis of genetic structure of populations and it is a choice of molecular markers for tree species with no previous knowledge. The objectives of this study were to evaluate the genetic variability, to select RAPD primers for genetic structure studies of populations, and to identify fragments of conserved regions of the apuleia genome with potential for sequencing. DNA samples were extracted with adaptation of the cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method. RAPD reactions were prepared with 18 primers and run for about two hours with 60 V. Fragments were visualized in 1.2% (w/v) agarose gels, containing 3 µL of ethidium bromide. Gels were visualized with a trans-illumination UV and recorded with a photo documentation system. The fragments were scored as the absence (0) or presence (1), generating a binary matrix. Total polymorphism and the relative contribution of each primer for the polymorphism were calculated. The polymorphism information content (PIC) was calculated for each fragment and primer. Cluster analysis was based upon Jaccard similarity and UPGMA method. Both the DNA extraction and the PCR-RAPD amplification reactions were highly acceptable. The RAPD marker is efficient for genetic analysis and identified high variability in apuleia. Genetic variability studies of apuleia can efficiently be done with eleven RAPD selected primers. One primer also showed monomorphic fragments, which are feasible for sequencing with the perspective of specific primer design for apuleia.

Keywords: Apuleia, polymorphism, PIC, primer selection, cluster analysis.

5.1 INTRODUÇÃO

Pertencente à família Fabaceae, a *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbride (grápia) é uma espécie arbórea da Mata Atlântica e considerada a rainha das florestas nos estados sulinos. A grápia é uma planta monóica (CARVALHO, 2003) e provavelmente alógama (SAMPAIO e VENTURIERI, 1990), que ocorre naturalmente desde o Peru (BACKES e IRGANG, 2004; MENDONÇA FILHO, 1996) até o Uruguai (SOBRAL, 2006), sendo que no Brasil ocorre desde o Sul até Norte e Nordeste (CARVALHO, 2003). A madeira é considerada nobre e apresenta elevado valor na indústria madeireira, sendo indicada para

estruturas externas, construção civil, marcenaria, energia, celulose, entre outros fins (CARVALHO, 2003). Além disso, a grápia tem potencial medicinal, sendo recentemente realizada a purificação, caracterização e a atividade antimicrobiana da proteína lectina ApulSL, extraída das sementes (CARVALHO et al., 2015). O extrato dos frutos foi avaliado quanto à atividade biocida, o qual apresenta limitada citotoxicidade *in vitro* e alto potencial como fonte de protótipos no desenvolvimento de drogas antibiofilme (SILVA et al., 2014).

Pela qualidade da madeira e pelo alto valor industrial, a grápia deve ser considerada como prioritária para a conservação (MEDEIROS et al., 2011). A espécie está ameaçada de extinção, sendo classificada com vulnerável na Lista Vermelha do Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA, 2012) e criticamente em perigo no Estado do Rio Grande do Sul (Decreto nº 52.109, de 1º de dezembro de 2014). O conhecimento da ecologia e da estrutura genética das populações naturais de espécies arbóreas tropicais são limitados, devido à alta diversidade e complexidade das mesmas, sendo, inegavelmente, essenciais para a definição de estratégias de conservação, de melhoramento genético e para o desenvolvimento de estratégias de manejo sustentado (KAGEYAMA et al., 2003). Para espécies em risco de extinção, com restrita ou raras distribuição em florestas nativas, os estudos de análise genética assumem ainda maior importância (JUCHUM et al., 2007), pois contribuem para a definição de áreas de grande variabilidade genética, assim como para a definição de estratégias para a sua conservação (SANTOS et al., 2007).

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a análise e detecção de variabilidade genética ao nível de DNA. Grande variedade de marcadores moleculares foram desenvolvidos e utilizados em muitas espécies vegetais (CAIXETA et al., 2009), os quais são fundamentais para realizar a análise genética, quantificar a variabilidade dentro e entre populações, entre outros fins (BECKMANN et al., 2006). *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) é um marcador molecular que garante uma boa amostragem do genoma do indivíduo, permitindo a detecção de polimorfismo por um custo relativamente baixo (PIGATO e LOPES, 2001). Marcadores RAPD são fragmentos de tamanho variável, gerados a partir da amplificação com um oligonucleotídeo iniciador constituído de bases arbitrárias (geralmente 10 nucleotídeos) (WILLIAMS et al., 1990).

Por serem marcadores especialmente oportunos para espécies em que não há conhecimento prévio sobre o genótipo ou mesmo sobre a estrutura genética das populações, os RAPD têm proporcionado grande avanço na análise de polimorfismo molecular e na

geração de dados genéticos em um grande número de espécies (CAIXETA et al., 2009). Apesar de baixa reprodutibilidade, baixo número de marcadores obtidos por iniciador e baixo valor informativo por loco, uma vez que são de herança dominante (BORÉM e CAIXETA, 2009), os marcadores RAPD caracterizam-se pela simplicidade, rapidez na obtenção de dados, custo relativamente reduzido comparado com outras técnicas moleculares, além da utilização imediata a qualquer tipo de organismo, entre outras (FALEIRO, 2007; CAIXETA et al., 2009). Assim, os marcadores RAPD foram utilizados para a caracterização da variabilidade genética de espécies arbóreas nativas brasileiras como *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. (RODRIGUES et al., 2012), *Poincianella pyramidalis* (MENDES et al., 2014, SANTOS et al., 2012), *Calophyllum brasiliense* (SCHÜHLI et al., 2013; MENDONÇA et al., 2014) e *Hancornia speciosa* Gomes (SILVA et al., 2012). Também foram utilizados para espécies ameaçadas de extinção como *Dalbergia nigra* (JUCHUM et al., 2007), *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A. C. Smith, *Myracrodruon urundeuva* M. Allem. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. (SANTOS et al., 2007).

Estudos com marcadores isoenzimáticos realizados em aproximadamente 50 indivíduos em nove populações de grápia localizadas em locais de grande fragmentação florestal, mostraram alta diversidade em sistemas isoenzimáticos. Esses resultados demonstram o potencial desta espécie em manter a variação genética a longo prazo. Também foi observado elevado índice de fixação que evidencia déficit de heterozigotos, possivelmente reflexo de um histórico de cruzamentos entre aparentados e de reduzidos tamanhos populacionais, decorrentes da exploração madeireira realizada em um passado recente. Também foi observada baixa divergência genética entre as populações de *A. leiocarpa*, duas populações apresentaram alelos exclusivos e todas apresentaram alelos raros, reforçando a ideia de que a fragmentação e a redução dos tamanhos populacionais vêm influenciando a estrutura e diversidade genética (STEINER, 2014).

Considerando que a grápia é uma espécie relevante para a conservação em função do risco de extinção da natureza, pela importância e pelo alto valor para a indústria madeireira e pelo restrito conhecimento genético disponível, que se restringe ao sequenciamento dos genes que codificam o cloroplasto e a proteína ribossomal (DOYLE et al., 1997; BRUNEAU et al., 2008; GENBANK, 2016), foi realizada esta análise genética de uma população utilizando marcadores RAPD. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a variabilidade genética, selecionar iniciadores RAPD para o estudo da estrutura genética de populações, e identificar

fragmentos com potencial para o sequenciamento de regiões conservadas do genoma da grápia, para posteriores estudos de diversidade nucleotídica.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Extração do DNA

O material vegetal consistiu de folhas de oito plantas matrizes adultas e de 80 plantas de três anos de idade, produzidas a partir de sementes de outras três plantas matrizes, que pertencem ao Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (MPVP), Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. Após coletadas, as folhas foram mantidas em liofilizador por sete dias, até a desidratação total do tecido foliar, e posteriormente em temperatura ambiente por aproximadamente duas semanas, quando foi extraído o DNA.

O método de extração foi adaptado de Doyle e Doyle (1990), sendo as amostras de tecidos foliar das 88 plantas de grápia congeladas em nitrogênio líquido, maceradas em cadinho cerâmico e transferidas para tubos do tipo *Eppendorf*. Posteriormente, adicionou-se ao macerado 700µL de tampão de extração brometo de cetil trimetil amônia (CTAB), os quais foram mantidos em banho-maria a 65ºC durante 25 minutos, sendo agitados a cada dez minutos. Em seguida, foi adicionado ao extrato vegetal 650 µL de clorofórmio-alcóol isoamílico (24:1 v/v) e centrifugados por 7 minutos à 14000 rpm a fim de separar as fases. Da fase superior aquosa retirou-se 500 µL e adicionou-se o mesmo volume de isopropanol para a precipitação do DNA. Após agitação, o material foi centrifugado novamente por 7 minutos à 14.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o DNA lavado com etanol 70% para remoção de sais. A amostra de DNA foi posta para secar a temperatura ambiente, e posteriormente ressuspendida em 30 µL de tampão Tris-HCl pH 8,0 adicionado RNAse na concentração de 10µg/mL. A concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro tipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), e a qualidade das amostras avaliada por meio da aplicação de 3 µL em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

5.2.2 Reações de amplificação PRC-RAPD

Para as reações, as amostras de DNA foram diluídas a 20ng/µL e os procedimentos adaptados de Williams et al. (1990). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25,1 µL, compostas por 20 ng de DNA de cada amostra de grápia, 1X PCR reaction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 1,6 mM de $MgCl_2$, 0,12 mM de mix de dNTP, 0,16 µM de iniciador (Tabela 1), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e completado o volume com água ultrapura esterilizada em autoclave. As condições de amplificação consistiram em um ciclo de desnaturação inicial de 94ºC por 5 min seguidos de 40 ciclos de 94ºC, 37ºC e 72ºC, todos por 1 min e um ciclo de extensão final à 72ºC por 7 min.

Foram testados 26 iniciadores RAPD, sendo apresentados na Tabela 1 somente os 18 iniciadores que resultaram em amplificações de boa qualidade. As reações de amplificação foram realizadas uma vez para cada iniciador, e a visualização dos fragmentos da RAPD-PCR foi realizada em gel de agarose preparado a 1,2% (p/v) em tampão TBE pH 8,0, contendo 3 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) e submetido à eletroforese por aproximadamente duas horas com potência de 60 V. Os géis foram analisados em transiluminador UV e registrados através de um sistema de fotodocumentação (EDAS 290 - Kodak). A extração e quantificação do DNA, análise de RAPD e fotodocumentação dos géis foram realizadas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pertencente à Universidade São Paulo (USP), Piracicaba, SP.

5.2.3 Polimorfismo dos marcadores RAPD

Para análise estatística dos dados, os fragmentos com intensidade média e alta foram identificados visualmente nos géis por dois avaliadores independentes. Destes perfis foi gerada uma matriz de dados binários, onde os fragmentos do RAPD-PCR foram pontuados como ausência (0) e presença de fragmento. Os fragmentos foram considerados polimórficos quando a ocorrência foi menor que 99% em relação à totalidade observada. A contribuição relativa para o polimorfismo por iniciador e o polimorfismo total foi calculada com base no número de fragmentos polimórficos em relação ao total observado. Também foi calculado o conteúdo de informação polimórfica (PIC) para fornecer uma estimativa do poder discriminativo do iniciador. Para tal, foi calculada a frequência alélica por meio de contagem direta no gel de revelação, aplicando-se a fórmula $PIC = 1-\Sigma p_i^2$ em que p_i é a frequência do fragmento i de um total de *k* fragmentos considerados no iniciador (WEILER et al., 2010).

5.2.4 Número adequado de marcadores RAPD para análise genética

Com o intuito de verificar se o número de fragmentos polimórficos gerados pelos 18 iniciadores de RAPD foram suficientes para determinar, com precisão, as estimativas de diversidade genética entre os genótipos, foi realizada a análise de otimização pelo Programa GENES (CRUZ, 2006). Pelo programa, obtiveram-se as estimativas de correlação de valores da matriz de dissimilaridade original com os de outras matrizes de dissimilaridade, levando-se em consideração diferentes números de fragmentos. Também foi obtida a soma dos quadrados dos desvios (SQd) em relação às reamostragens e o valor de estresse (E), que indicam o ajuste entre as matrizes original e amostral. O número ideal de fragmentos polimórficos foi considerado quando o estresse assumiu valor menor que 0,05, conforme indicado por Kruskal (1964). Com base no número de fragmentos polimórficos, no PIC e na contribuição relativa para o polimorfismo total de cada iniciador foram selecionados, com o auxílio da análise multivariada obtida a partir da distância Euclidiana, os melhores iniciadores para estudar a variabilidade genética da grápia.

5.2.5 Distância genética entre os genótipos de grápia

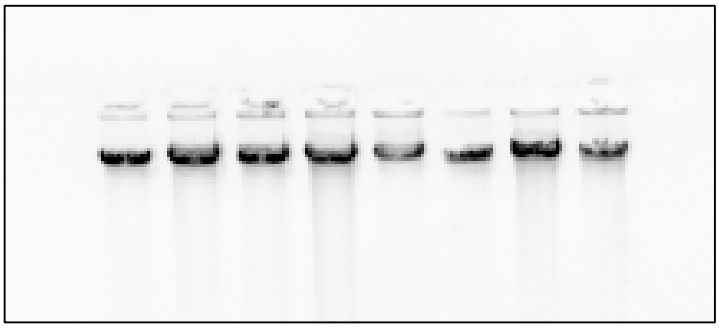
Para análise da diversidade genética entre os genótipos de grápia, duas matrizes de distâncias genéticas foram geradas baseadas nos índices de Jaccard, considerando todos os iniciadores e os iniciadores selecionados, as quais foram comparadas pelo teste de Mantel com 1000 permutações (MANTEL, 1967) e significância testada pelo teste t. Posteriormente, foi gerado um dendrograma pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) considerando apenas os iniciadores selecionados. A consistência de cada agrupamento foi analisada por meio do cálculo da correlação cofenética entre as matrizes de coeficientes de dissimilaridade e as dos valores cofenéticos (SOKAL e ROHLF, 1962). O ponto de corte foi definido pelo método de Mojena (1977) pela fórmula $Pc = m + kdp$, sendo m a média dos valores de distância dos níveis de fusão correspondentes aos estádios; k como um valor fixo e igual a 1,25 (MILLIGAN e COOPER, 1985) e dp o desvio padrão. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software GENES (CRUZ, 2006), com exceção da seleção de iniciadores, realizada com o auxílio do software Action versão 2.5.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Extração de DNA

A metodologia de extração do DNA da grápia foi satisfatória, pois resultou na obtenção de amostras de boa qualidade e quantidade suficientes para realizar este estudo (Figura 5). Este resultado é importante, pois o isolamento e a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade são essenciais para os estudos de análise genética, ou seja, o DNA obtido deve estar íntegro, livre de impurezas e ser passível de amplificação (KIDWELL e OSBORN, 1992; MILACH, 1998). Além disso, aparentemente não houve diferença entre as amostras de DNA obtidas das folhas de plantas adultas em comparação com folhas de plantas de três anos de idade, devido as possíveis diferenças nos teores de compostos fenólicos que podem interferir nos procedimentos de extração (MITTON et al., 1979).

Figura 6 – Amostras de DNA genômico de grápia (*Apuleia leiocarpa*) visualizadas em gel de agarose à 1,0% de concentração.

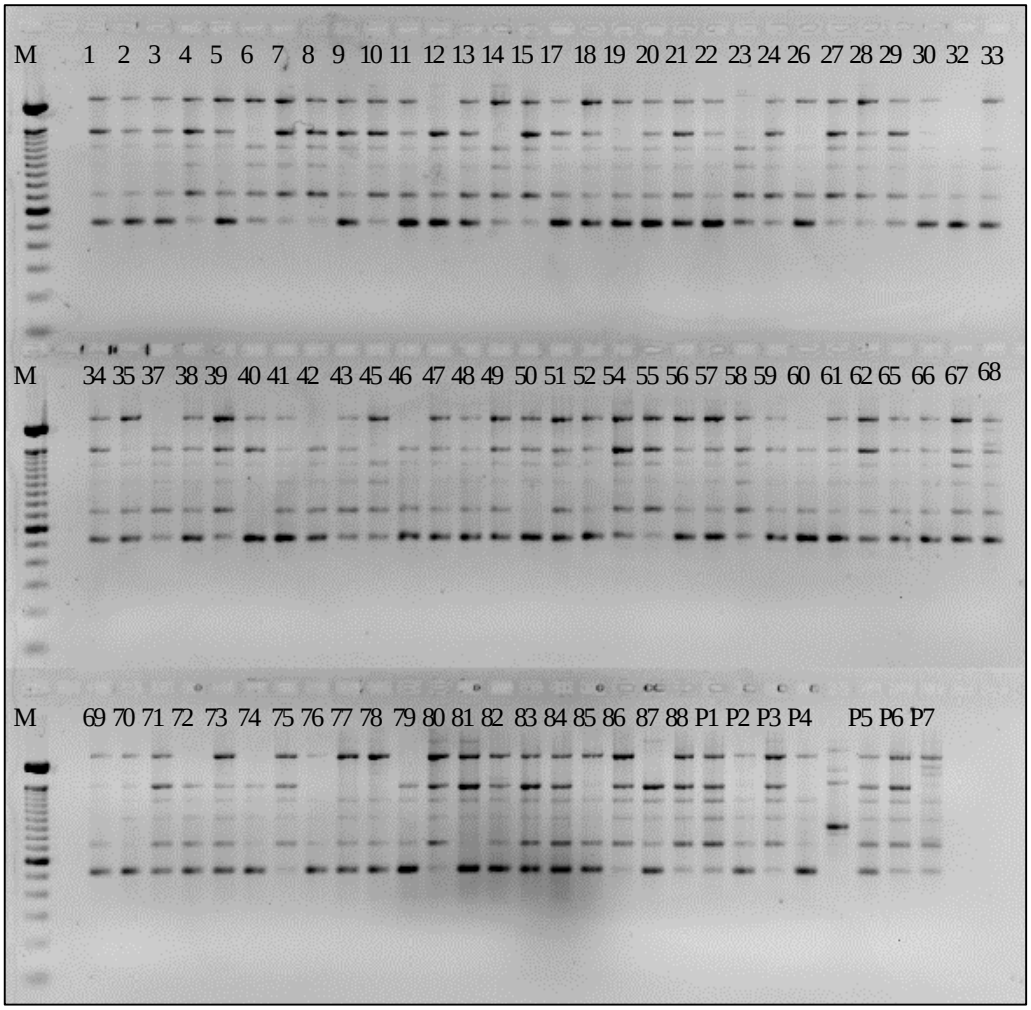


5.3.2 Reações de amplificação PCR-RAPD

A padronização das condições de amplificação também foi adequada, com a obtenção de fragmentos de fácil visualização em geis de agarose. Foram avaliados 26 iniciadores RAPD, dos quais 18 (Tabela 7) amplificaram fragmentos polimórficos e com boa resolução (Figura 6), sendo utilizados para a análise genética da grápia. Foram descartados da análise oito iniciadores RAPD por não atenderem aos critérios estabelecidos. Além disso, as análises foram realizadas considerando 82 dos 88 genótipos de grápia avaliados, sendo

desconsiderados aqueles que apresentaram fragmentos duvidosos ou de baixa qualidade de resolução.

Figura 7 – Gel de agarose a 1,2% com 88 genótipos de *Apuleia leiocarpa* amplificados com o iniciador RAPD 13. A extremidade esquerda contém marcador de 100pb (M). P = plantas matrizes adultas e as demais mudas de três anos de idade.



5.3.3 Polimorfismo dos marcadores RAPD

Os iniciadores utilizados permitiram a identificação de 92 bandas de amplificação (fragmentos), dos quais 75 foram polimórficos, com número médio de quatro fragmentos por iniciador. A porcentagem de fragmentos polimórficos foi elevada (81,45%), indicando o potencial da técnica para a caracterização genética de populações de grápia (Tabela 7). Além

disso, foi possível observar elevada variabilidade genética entre os indivíduos de grápia, especialmente quando comparada a outras espécies da mesma família botânica e que compartilham risco de extinção ou modo de reprodução. Em *Dalbergia nigra*, espécie também ameaçada de extinção, foram obtidos 112 fragmentos com 16 iniciadores RAPD, dos quais 39% apresentavam polimorfismo (JUCHUM et al., 2007). Em *D. oliveri* 38,1% dos fragmentos foram polimórficos (PHONG et al., 2011). Já em *Caesalpinia pulcherrima* nenhum dos 246 fragmentos obtidos com 94 iniciadores RAPD foram polimórficos (RODRIGUES et al., 2012). Estes resultados mostram que a grápia, comparada com outras espécies da mesma família, apresenta maior polimorfismo, facilmente detectado por marcadores RAPD, justificando o uso desta técnica em futuros estudos.

Tabela 8 – Identificação dos iniciadores RAPD analisados com suas respectivas sequências de bases, número de fragmentos amplificados e polimórficos, contribuição relativa para o polimorfismo por iniciador (%) e polimorfismo total obtidos da amplificação de DNA genômico de *Apuleia leiocarpa*.

Iniciador		Sequencia das bases do iniciador	Número de fragmentos		Polimorfismo (%)
			Amplificados	Polimórficos	
1	OPC-20	5’-ACTTCGCCAC-3’	4	4	4,34
2	OPV-17	5’-ACCGGCTTGT-3’	2	1	1,08
3	OPG-17	5’-ACGACCGACA-3’	6	5	5,43
4	OPL4-525	5’-GACTGCACAC-3’	7	6	6,52
5	OPAN-03	5’-AGCCAGGCTG-3’	3	2	2,17
6	OPB-10	5’-CTGCTGGGAC-3’	3	2	2,17
7	OSAW-08	5’-CTGTCTGTCG-3’	8	8	8,69
8	OPJ-01	5’-CCCGGCATAA-3’	9	9	9,78
9	OPJ-04	5’-CCGAACACGG-3’	3	3	3,26
10	OPI-15	5’-TCATCCGAGG-3’	3	3	3,26
11	OPAN-01	5’-ACTCCACGTC-3’	8	7	7,60
12	OPAW-14	5’-GGTTCTGCTC-3’	8	6	6,52
13	OPAS-02	5’-GTCCTCGTGT-3’	6	6	6,52
14	OPA-13	5’-CAGCACCCAC-3’	8	3	3,26
15	OPAS-08	5’-GGCTGCCAGT-3’	4	4	4,34
16	OPAS-14	5’-TCGCAGCGTT-3’	3	2	2,17
17	OPJ-05	5’-CTCCATGGGG-3’	2	1	1,08
18	OPAN-19	5’-ACCACGCCTT-3’	5	3	3,26
Total			92	75	81,45

O maior número de fragmentos amplificados foi observado nos iniciadores OSAW-08 (8 fragmentos) e OPJ-01 (9 fragmentos), além de que todos os fragmentos foram polimórficos com esses iniciadores, o que resultou na maior contribuição relativa para o polimorfismo total.

Estes dois iniciadores RAPD, juntamente com OPL4-525, OPAN-01, OPAW-14 e OPAS-02 explicaram mais da metade (45,6%) do polimorfismo total entre os indivíduos de grápia. Em contrapartida, os iniciadores OPV-17 e OPJ-05 apresentaram o menor polimorfismo, ambos com dois fragmentos revelados, sendo apenas um polimórfico (Tabela 7).

Os valores de PIC variaram de 0,09 até 0,67 para os diferentes iniciadores, sendo OSAW-08 e OPJ-01 os mais informativos para a variabilidade genética da grápia (Tabela 8). O PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório de um iniciador, sendo que iniciadores com valores superiores a 0,5 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,5 mediamente informativo e valores inferiores a 0,25 pouco informativos (WEIR, 1996; BOTSTEIN et al., 1980). Com base nestes parâmetros, os iniciadores OSAW-08, OPJ-01, OPC-20, OPAS-14, OPG-17, OPAW-14, OPJ-05, OPAN-01 e OPJ-04 são muito informativos do polimorfismo entre os genótipos de grápia, ou seja, a metade dos iniciadores utilizados para a análise genética apresentaram PIC superior a 0,5, confirmando a viabilidade de utilização da técnica de RAPD em grápia. Portanto, os marcadores RAPD podem ser utilizados para a análise genética da grápia pelas vantagens inerentes à técnica associadas ao alto polimorfismo, o que não é comum para outras espécies da mesma família, a exemplo da *D. oliveri*, em que os valores de PIC variaram de 0 a 0,544 entre 29 iniciadores RAPD testados (PHONG et al., 2011).

No caso da técnica de RAPD, o PIC é adotado como uma medida que está relacionada com o número de fragmentos, que, por sua vez, está diretamente associado à variabilidade genética e ao número de genótipos em estudo (MALONE et al., 2007). Assim, o iniciador OPJ-01, além do satisfatório valor informativo, este também apresentou o maior número de fragmentos amplificados (Tabela 7 e 8). Entretanto, pode-se observar que o maior número de fragmentos amplificados não é sinônimo de informação de polimorfismo, visto que o iniciador OPA-13 amplificou também oito fragmentos, mas com valor informativo do polimorfismo pouco representativo. Isso se deve a frequência de cinco dos oito fragmentos ser igual a um, os quais mesmo amplificados não representam polimorfismo entre os genótipos (Tabela 8).

De modo geral, as frequências de fragmentos variaram de 0,05 a 1,0. Os fragmentos de menor frequência foram detectados com os iniciadores OSAW-08 e OPAN-01, ou seja, esses iniciadores apresentaram satisfatório valor informativo de polimorfismo e ainda são bons candidatos para identificar regiões mais conservadas do genoma da grápia. Iniciadores

que detectam alelos menos frequentes podem ser importantes para o monitoramento das populações naturais, visto que, caso não haja medidas de manutenção dos fragmentos. É presumível que alelos pouco frequentes sejam perdidos ao longo das gerações, mesmo a grápia aparentemente apresentar boa capacidade de se restabelecer em ambientes fragmentados e recuperar níveis de heterozigosidade com o passar de gerações (STEINER, 2014).

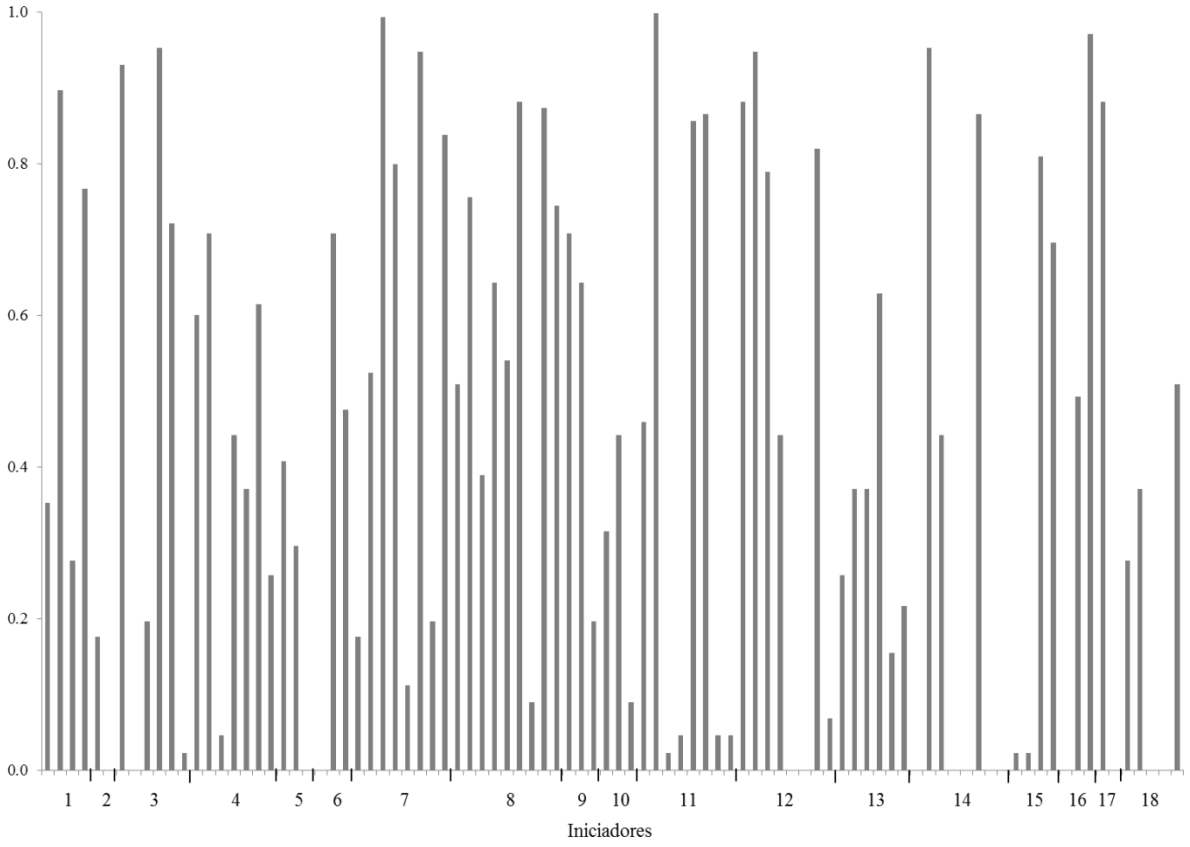
Tabela 9 – Frequências fragmentos e valores de conteúdo de informação para o polimorfismo (PIC) para os 18 iniciadores RAPD utilizados para a análise genética de *Apuleia leiocarpa*.

Ordem	Identificação	Fragmentos									PIC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	OPC-20	0,80	0,32	0,85	0,48						0,62
2	OPV-17	0,91	1,00								0,09
3	OPG-17	0,26	1,00	0,90	0,22	0,53	0,99				0,58
4	OPL4-525	0,63	0,54	0,98	0,75	0,79	0,62	0,86			0,45
5	OPAN-03	0,77	0,84	1,00							0,24
6	OPB-10	1,00	0,54	0,72							0,43
7	OSAW-08	0,91	0,69	0,08	0,45	0,94	0,23	0,90	0,40		0,67
8	OPJ-01	0,70	0,49	0,78	0,60	0,68	0,34	0,95	0,36	0,51	0,64
9	OPJ-04	0,54	0,60	0,90							0,54
10	OPI-15	0,83	0,75	0,95							0,29
11	OPAN-01	0,74	0,05	0,99	0,98	0,38	0,37	0,98	0,98		0,54
12	OPAW-14	0,34	0,23	0,46	0,75	1,00	1,00	0,43	0,97		0,58
13	OPAS-02	0,86	0,79	0,79	0,61	0,92	0,89				0,34
14	OPA-13	1,00	0,22	0,75	1,00	1,00	0,37	1,00	1,00		0,37
15	OPAS-08	0,99	0,99	0,44	0,55						0,45
16	OPAS-14	1,00	0,71	0,17							0,61
17	OPJ-05	0,34	1,00								0,55
18	OPAN-19	0,85	0,79	1,00	1,00	0,70					0,24

O iniciador OPV-17 foi o que apresentou o menor valor de PIC e, portanto, o iniciador com baixo potencial de fornecer informações sobre o polimorfismo entre os genótipos de grápia. A seleção de iniciadores que revelam fragmentos menos polimórficos também deve ser realizada, visto estes terem a capacidade de detectar fragmentos mais frequentes e níveis de polimorfismos mais reduzidos. Sobretudo, a análise pormenorizada por fragmento é importante para a identificação daqueles com padrão de ocorrência contínua na amostra em estudo, os quais podem representar regiões conservadas no genoma e servir como base para o

sequenciamento e estudos de diversidade nucleotídica. Nesse sentido, os iniciadores OPB-10, OPA-13, OPAS-14 e OPJ-05 apresentaram fragmentos monomórficos, onde o PIC foi igual a zero (Figura 7), combinado com bom padrão de resolução e intensidade. O sequenciamento desses fragmentos monomórficos pode levar ao desenvolvimento de iniciadores que amplificam sequências específicas. Além disso, com o sequenciamento de fragmentos de RAPD podem ser construídos pares de iniciadores mais específicos e longos, os quais são convertidos em marcadores codominantes, como SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), de alta especificidade (NIETSCHE et al., 2000; PARAN e MICHELMORE, 1993).

Figura 8 – Valores de conteúdo de informação para o polimorfismo (PIC) por fragmento dos 18 iniciadores RAPD utilizados para a análise genética de *Apuleia leiocarpa*.



5.2.4 Número adequado de marcadores RAPD para análise genética

Por terem sequências aleatórias e pela disponibilidade de um grande número de iniciadores RAPD, faz-se necessário a realização de uma triagem para identificar aqueles mais

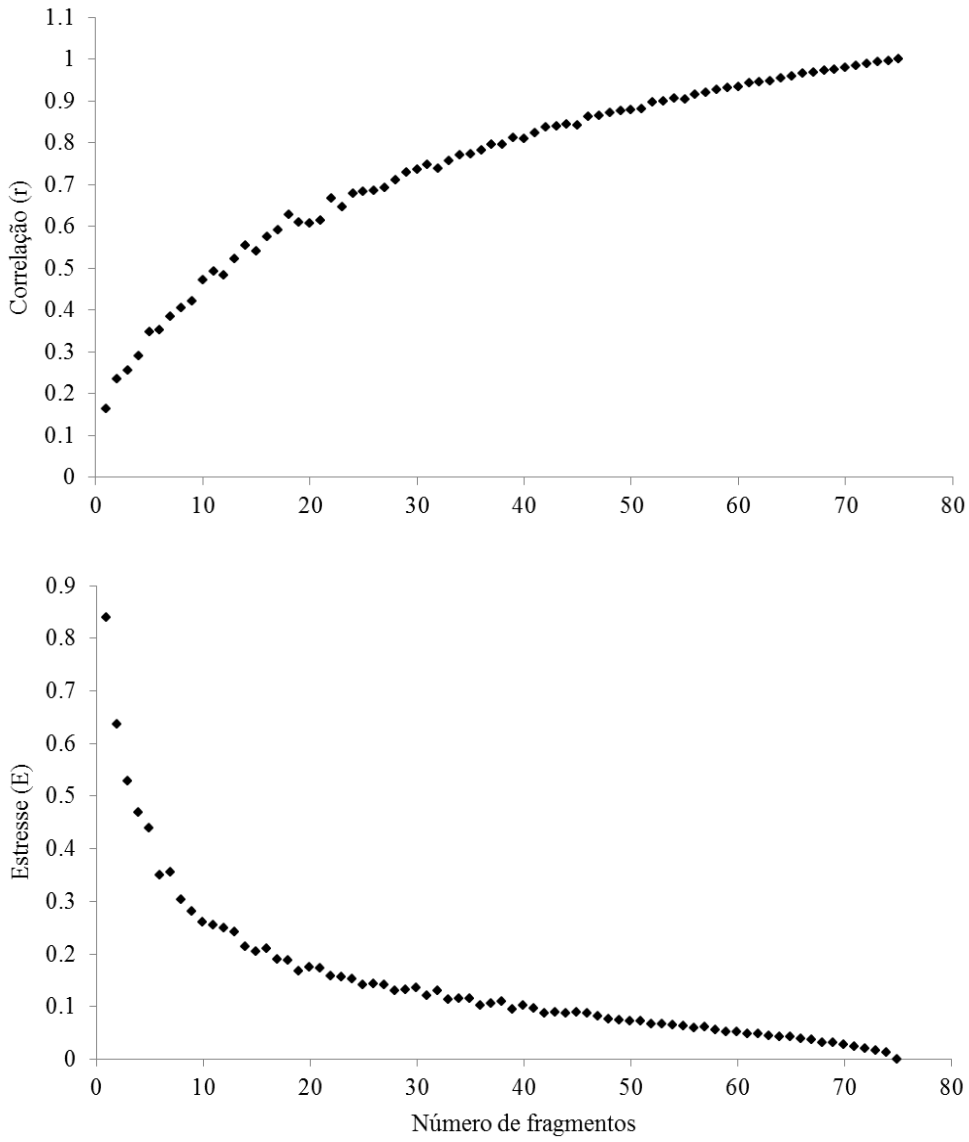
informativos e capazes de gerar fragmentos polimórficos, norteando futuros estudos genéticos. O número de fragmentos polimórficos obtido pelos 18 iniciadores RAPD utilizados foi aparentemente satisfatório para o estudo da diversidade genética da grápia. Entretanto, esse valor é bastante variável nas diferentes espécies (SOUZA et al., 2014) e pode ser um fator limitante para a análise genética por meio de marcadores RAPD. A relação entre o número de fragmentos polimórficos e a magnitude de correlação dos valores da matriz de similaridade comparada com os valores das matrizes de similaridade com diferente número de fragmentos (Figura 8) indica a veracidade das inferências. Elevada estimativa de correlação (r=0,942), baixos valores da soma dos quadrados dos desvios (SQd = 2,83) e valor do estresse (E=0,048) já foram obtidos com 61 fragmentos, indicando um bom ajuste entre os valores da matriz da similaridade original com as outras matrizes da similaridade. Segundo Kruskal (1964), resultados em que os valores de estresse são inferiores a 0,05 representam um excelente indicativo de precisão. Sendo assim, os 75 fragmentos polimórficos utilizados neste estudo são suficientes, dos quais 61 já estão de acordo com os números aceitáveis para estudos de diversidade genética em grápia. A análise genética com base em 61 fragmentos proporciona uma redução do número de reações necessárias para obtenção das informações requeridas, sem comprometer a precisão e a confiabilidade das análises.

Considerando o número total mínimo de fragmentos, o número de fragmentos amplificados, a contribuição relativa do polimorfismo e o conteúdo de informação polimórfica de cada iniciador, onze iniciadores RAPD (OPC-20; OPG-17; OPL4-525; OSAW-08; OPJ-01; OPJ-04; OPAN-01; OPAW-14; OPAS-02; OPA-13 e OPAS-08) foram selecionados como potenciais marcadores para estudos genéticos posteriores com grápia. Cabe salientar que o iniciador OPJ-01, além do maior número de fragmentos amplificados, maior conteúdo de informação polimórfica, também apresentou fragmentos com frequência de 0,05 (Tabela 8) e, portanto, capazes de detectar diferenças específicas entre os genótipos. Também o iniciador OPA-13, além de contribuir para identificação de polimorfismo também apresentou cinco fragmentos monomórficos, os quais podem servir de base para o sequenciamento do genoma e para desenhar iniciadores específicos.

Em outros estudos com espécies arbóreas utilizando marcadores RAPD foi observado que o número mínimo de fragmentos polimórficos necessários para revelar a diversidade entre genótipos ou populações é bastante variável. Neste estudo foram utilizados 75 fragmentos polimórficos, dos quais 61 foram suficientemente informativos para revelar a diversidade

entre os genótipos avaliados de grápia. Já em *Psidium guajava* L. foram utilizados 117 fragmentos (GOMES FILHO et al., 2010), em *Erythrina velutina* Willd 106 fragmentos (SOUZA et al., 2014), e em *Pothomorphe umbellata* (L.) apenas 25 fragmentos (VALLE et al., 2013). Para essas espécies, mesmo sem a identificação do número mínimo de fragmentos polimórficos, em todos os estudos foi encontrada uma elevada porcentagem de polimorfismo entre os genótipos analisados, respectivamente 87,9%, 85,7% e 96,1%, a exemplo deste trabalho com 81,4% (Tabela 7).

Figura 9 – Valores de correlações (r) e estresse (E) entre matrizes de similaridade obtidas para diferentes números de fragmentos polimórficos utilizados para a análise genética de *Apuleia leiocarpa*.

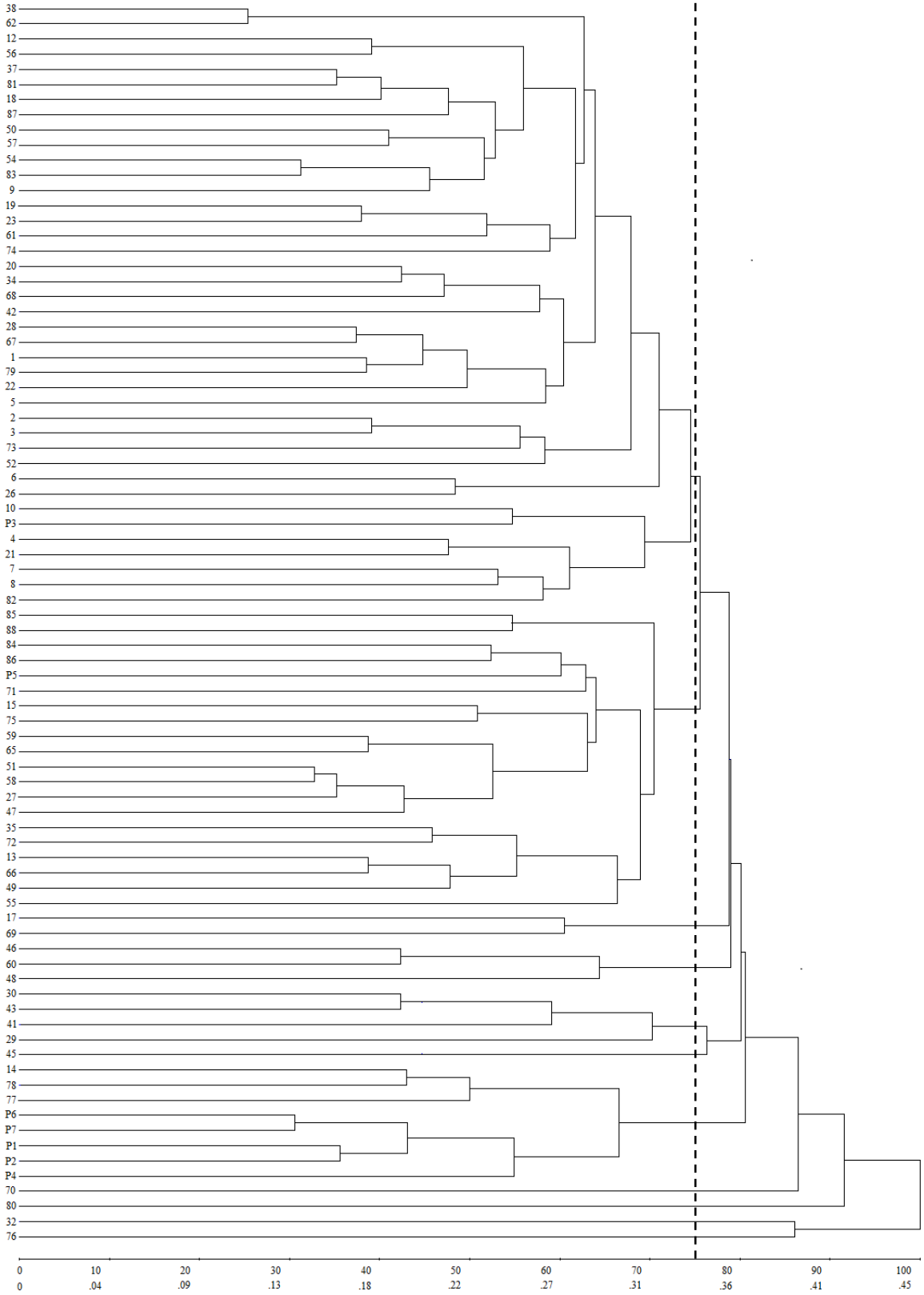


5.3.5 Distância genética entre os genótipos de grápia

O conhecimento da distância genética entre os genótipos de uma população de interesse é importante para um programa de melhoramento, pois permite a organização do germoplasma e uma amostragem mais eficiente de genótipos (NIENHUIS et al., 1993). Quando considerados todos os iniciadores no cálculo das distâncias genéticas entre os genótipos de grápia, a máxima distância foi observada entre 1 e 32 (0,435), sendo portanto os genótipos mais divergentes no estudo, e a menor distância observada entre os genótipos 54 e 62 (0,116), sendo os mais similares. Os resultados se assemelham quando considerados apenas os onze iniciadores RAPD selecionados, sendo observada a máxima distância genética entre os genótipos 1 e 32 (0,456) e a menor distância entre os genótipos 54 e 62 (0,118). As matrizes de distância genética geradas considerando todos os dezoito iniciadores e os iniciadores selecionados apresentaram correlação de Mantel elevada (0,92), positiva e altamente significativa ($P < 0,01$), indicando que os iniciadores selecionados mantiveram a capacidade de representar os coeficientes de dissimilaridade entre os genótipos estudados. Portanto, a análise de agrupamento com base na distância genética foi realizada considerando os 61 fragmentos polimórficos obtidos com onze iniciadores RAPD mais informativos.

Os genótipos de grápia foram agrupados pelo método hierárquico UPGMA a partir da matriz de distância genética baseada no índice de Jaccard, representando a dissimilaridade genética entre os mesmos (Figura 9). Foram distinguidos onze grupos, considerando o ponto de corte de 0,3401, proposto por Mojema (1977), ilustrando a existência de diferentes níveis de diversidade entre os genótipos estudados. O agrupamento apresenta confiabilidade, sendo considerado adequado com o valor cofenético obtido significativo a 0,1% ($r=0,676$ e $P=0,001$). O fato do valor de r ter sido ligeiramente abaixo de 0,7 pode indicar que possíveis distorções tenham ocorrido no momento da transformação dos dados originais da matriz de similaridade em dendrograma.

Figura 10 – Dendrograma por agrupamento UPGMA obtido a partir da matriz de distância genética baseada no índice de Jaccard representando a dissimilaridade genética entre os genótipos grápia. P = plantas matrizes adultas e as demais mudas de três anos de idade.



5.4 CONCLUSÃO

A realização deste trabalho possibilitou ampliar o conhecimento genético sobre a grápia, uma espécie arbórea nativa ameaçada de extinção. Houve boa adequação metodológica, tanto para a extração e obtenção de DNA em quantidade e qualidade satisfatórias a partir de amostras foliares de plantas de grápia, quanto para as reações de amplificação do PCR-RAPD. A elevada porcentagem de fragmentos polimórficos (81,7%) associada à divergência entre os genótipos de grápia, especialmente quando comparada a outras espécies da mesma família, indicam que os marcadores RAPD foram efetivos na detecção da variabilidade existente. Os resultados deste estudo sugerem que os 61 fragmentos polimórficos, obtidos a partir de onze iniciadores RAPD selecionados, revelaram suficiência amostral na detecção de polimorfismos, sendo capazes de explicar a diversidade genética da grápia e gerar um dendrograma que agrupou os genótipos com alta confiabilidade. Um dos iniciadores selecionados também apresenta fragmentos monomórficos, que podem ser utilizados para o sequenciamento e desenho de iniciadores específicos para a grápia, almejando estudos para detecção de diversidade nucleotídica. Este vem a ser o primeiro estudo com marcadores de DNA para a espécie, consistindo a base para futuros estudos dedicados ao entendimento da diversidade e estrutura genética de populações de grápia, uma necessidade iminente para a conservação, o manejo sustentável e o melhoramento dos recursos genéticos da espécie.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACKES, P.; IRGANG, B. 2004. **Mata Atlântica. As árvores e a paisagem**. Porto Alegre, Paisagem do Sul. 396p.

BECKMANN, M. Z.; LUZ, F. J. F.; PIVETTA, K. F. L. Marcador *f*AFLP na identificação da diversidade genética de mini-roseiras. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 139-144, 2006.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, H. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRUNEAU, A.; MERCURE, M.; LEWIS, G. P.; HERENDEEN, P. S. Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinioid legumes. **Botany**, v. 86, p. 697-718. 2008.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, C. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 371-442.

CARVALHO, A. de S.; SILVA, M. V. da; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M.; MALAFAIA, C. B.; SILVA, T. D. da; VAZ; A. F.; SILVA, A. G. da; ARRUDA, I. R.; NAPOLEÃO, T. H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. D.; CORREIA, M. T. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 75, p. 402-408, 2015.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1, 1039 p.

CNCFLORA. Centro Nacional de Conservação da Flora. Lista Vermelha. Disponível em: http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Dalbergia%20nigra. Acesso em: dez. 2015.

CRUZ, C.D. **Programa GENES** – Análise Multivariada e Simulação, Viçosa: Imprensa Universitária, 2006. 285p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-15, 1990.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; BALLENGER, J.A. et al. A phylogeny of the chloroplast gene rbcL in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, 84, p. 541-554, 1997.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

GENBANK. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ620926.1. Acesso em: dez. 2015.

GOMES FILHO, A.; OLIVEIRA, J.G.; VIANA, A.P.; SIQUEIRA, A.P.O.; OLIVEIRA, M.G.; PEREIRA, M.G. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.4, p. 627-633, 2010.

JUCHUM, F.S.; LEAL, J.B.; SANTOS, L.M.; ALMEIDA, M.P.; AHNERT, D.; CORRÊA, R.X. Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) using RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 3, p. 543-553, 2007.

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

KIDWELL, K.K.; OSBORN, T.C. Simple plant DNA isolation procedures. In: BECKMANN, J.S.; OSBORN, T.C. **Plant genomes**: methods for genetic and physical mapping. London: Kluwer Academic Publ., 1992. p.1-13.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; CASTRO, M. A. da. S. de.; ARIAS, L. N.; MENEGHELLO, G. E.; PESKE, S. T. Caracterização bioquímica e molecular de acessos de arroz vermelho coletados no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. n. 37, v. 2, p. 77-85, jun. 2007.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, n.2, p.209-220, 1967.

MEDEIROS P. M. de; ALMEIDA, A. L. de, SILVA, T. C. da; ALBUQUERQUE, U. P. de. Pressure indicators of wood resource use in an Atlantic forest area, northeastern Brazil. **Environment Management.** n. 47, v. 3, p. 410-24, 2011.

MENDES, R.F.M.; ARAUJO NETO, R.B.; NASCIMENTO, M.P.S.B.C.; LIMA, P.S.C. RAPD analysis of the genetic diversity among accessions of Fabaceous forages (*Poincianella* spp) from the Caatinga. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 5832-5839, 2014.

MENDONÇA, E. G.; SOUZA, A. M. de; VIEIRA, F. de A.; ESTOPA, R. A.; REIS, C. A. F., CARVALHO, D. de. Using Random Amplified Polymorphic DNA to Assess Genetic Diversity and Structure of Natural *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) Populations in Riparian Forests. **International Journal of Forestry Research**, v. 2014, p. 1-9. 2014.

MENDONÇA FILHO, C. V. **Braúna, angico, jacarandá e outras leguminosas de Mata Atlântica**: Estação Biológica de Caratinga, Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Botânica: Margaret Mee: Fundação Biodiversitas: AP.EBC: IEF: FZB-BH: SB-MG, 1996.100 p.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. 141p.

MILLIGAN GW; COOPER MC. 1985. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika,** n. 50, p. 159-179.

MITTON, J. B.; LINHART, Y. B.; STURGEON, K. B.; HAMRICK, J. L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Ponderosa pine. **Journal of Heredity**, v.70, n.2, p.86-89, 1979.

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

NIENHUIS, J. et al. Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lanatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the America Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.2, p.300-306, 1995.

NIETSCHE, S. et al. RAPD and SCAR markers linked to gene confering resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal Phytopathology**, v. 148, n.117, p. 117-21, 2000.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR of the manuscript based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, n. 8, p. 985-93, 1993.

PHONG, D. T.; HIEN, V. T. T.; THANH, T. T. V.; TANG, D. V. Comparison of RAPD and ISSR markers for assessment of genetic diversity among endangered rare *Dalbergia oliveri* (Fabaceae) genotypes in Vietnam. **Genetics and Molecular Research**, n. 10, v. 4, p. 2382-2393, 2011.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 60, p. 135-148, dez. 2001.

RODRIGUES, M. G. F.; MAZZINI, R. B.; PIVETTA, K. F. L.; ALVES, M. DE C.; DESIDÉRIO, J. A. Characterization of the genetic variability among *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. (Fabaceae) plants using RAPD molecular markers. **Acta Scientiarum**. Agronomy. Maringá, v. 34, n. 3, p. 259-263, July-Sept., 2012.

SAMPAIO, P. de T. B.; VENTURIERI, G. A. Variação genética entre e dentro de progênies de quatro espécies de leguminosas: *Copaifera muttijuqe* Hayne; *Hymenaea courbaril* Linn.; *Apuleia leiocarpa* e *Hymenolobium* sp. Silvicultura, São Paulo, n. 42, t. 3, p. 633-635, 1990. **Anais...** do 6° Congresso Florestal Brasileiro, 1990, Campos do Jordão.

SANTOS, J. S.; MENDES, S. S.; CONDE, D. C.; DELMONDEZ, R. C.; MANN, R. S.; THOMAZZI, S. M. Genetic diversity assessment of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz accessions using RAPD markers. **Scientia Plena**, v.8, n. 3, p. 1-8, 2012.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. de; KIILL, L. H. P.; SÁ, I. I. S. Variabilidade genética, com base em marcadores RAPD, de três espécies arbóreas ameaçadas de extinção no semi-árido brasileiro. **Scientia Forestalis**. n. 74, p. 37-44, junho 2007.

SCHÜHLI, G. S.; OLIVEIRA, T. W. G. de; OLIVEIRA, M. S. P. de; FOWLER, J. A. P. Genetic selection of *Calophyllum brasiliense* for seed Orchards. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n.4, p. 371-377, 2013.

SEOANE, C.E.S.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 57, p. 123-139, 2000.

SILVA, L.N.; TRENTIN, D. da S.; ZIMMER, K.R.; TRETER, J., BRANDELLI, C.L., FRASSON, A.P.; TASCA, T.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; MACEDO, A. J. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology,** n. 53, v. 3, p. 464-468, 2014.

SILVA, A. V. C. da; RABBANI, A. R. C.; SENA-FILHO, J. G. de; ALMEIDA, C. S.; FEITOSA, R. B. Genetic diversity analysis of mangaba (*Hancornia speciosa G*omes), an exotic brazilian tropical species. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, n. 15, v. 2012, p. 217 – 225, 2012.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil.** São Carlos: RiMa: Novo Ambiente, 350 p. 2006.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxonomy,** v.11, n.1, p. 30-40, 1962. 359p.

SOUZA, D. C. L.; SILVA-MANN, R.; MELO, M. F. de V. Indicadores de sustentabilidade para conservação genética de *Erythrina velutina* Willd., em área de mata ciliar. **Revista Árvore**, Viçosa, v.38, n.6, p.1103-1113, 2014.

STEINER, F. **Diversidade genética e análise da paisagem de espécies arbóreas da floresta Estacional Decidual**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis. 152 p. 2014.

VALLE, J.S.; FONSECA, B.K.D.; NAKAMURA, S.S.; LINDE, G.A.; MATTANA, R.S.; MING, L.C.; COLAUTO, N.B. Diversidade genética de populações naturais de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] por RAPD. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.1, p.47-53, 2013.

WEILER, R. L.; BRUGNARA, E. C.; SCHWARZ, S. F.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M. A. SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.7, p.1523-1529, 2010.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis: methods for discretion population genetic data. Sunderland**: Sinauer Associates, 1996. 377p.

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

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do valor madeireiro e das funções medicinais, associado aos aspectos ecológicos singulares e iminência de desaparecimento da natureza, fica evidente a relevância dos estudos relacionados à propagação e o resgate de *Apuleia leiocarpa* (KLEIN, 1972; CARVALHO, 2003; SILVA et al., 2014; CARVALHO et al., 2015). Não obstante, características inerentes à espécie e aos genótipos fazem com que a reprodução sexuada de grápia seja dificultada. Esse fato é corroborado por estudos que apontam que esta espécie, assim como outras ameaçadas de extinção, é raramente incluída em plantios de restauração florestal, sobretudo pela dificuldade de obtenção de sementes e mudas desses indivíduos (BRANCALION et al., 2009).

Esses fatos justificaram o desenvolvimento do presente estudo, o qual buscou complementar e disponibilizar novas informações referentes à propagação vegetativa de grápia por micropropagação. Os trabalhos anteriormente desenvolvidos se resumem ao estabelecimento de plântulas assépticas, multiplicação a partir de segmentos nodais e de microcepas mantidas *in vitro* (LENCINA, 2013; LENCINA et al., 2014). Novas investigações foram realizadas sobre a manutenção *in vitro* de microcepas, especialmente por ser um método promissor, visto que esse material vegetativo se consiste da parte da plântula asséptica que seria descartada após a retirada dos segmentos nodais e apical, no processo convencional de multiplicação *in vitro.* Também foi avaliado o enraizamento adventício e aclimatização de plantas de grápia.

Os resultados deste trabalho mostram que a manutenção de microcepas por 30 dias em meio de cultura acrescido de 8,8 µM de BAP, com posterior subcultivo em meio de cultura sem citocinina, favorece a formação de brotos adventícios. Além disso, o meio de cultura ½ MS aumenta a formação de brotos e de calo nas raízes das microcepas, enquanto o meio WPM favorece o alongamento das brotações. O uso do carvão ativado também favorece o alongamento dos brotos e o número de microestacas por broto e por microcepa, enquanto o meio de cultura sem suplementação de carvão ativado maximiza a formação de calos e de brotações via organogênese indireta. As coletas sucessivas favorecem a formação de brotos, entretanto resulta em redução do crescimento e da taxa de multiplicação.

Considerando o número de microestacas por microcepa, a manutenção *in vitro* de microcepas de grápia possibilita a obtenção de cerca de seis explantes por coleta, totalizando

até 18 explantes por microcepa ao final das três coletas (90 dias), ao passo que, cada planta de grápia estabelecida *in vitro* forneceria em média apenas 1,8 explantes para a multiplicação, aos 30 dias de cultivo (LENCINA et al., 2014). Sendo assim, a manutenção das microcepas *in vitro* aumenta a taxa de multiplicação em 10 vezes, demonstrando claramente o potencial de utilização na micropropagação de grápia, pelo fornecimento de explantes que são empregados no enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, assim como para a conservação de germoplasma. Estudos relacionados à avaliação da capacidade de produção das microcepas, do número de subcultivos, e da capacidade morfogenética indireta são relevantes, tanto para a conservação quando para a multiplicação *in vitro* dagrápia.

Quanto ao enraizamento adventício, foi possível observar que grápia é uma espécie de difícil enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, ao se considerar que as maiores porcentagens de enraizamento foram 28,9% e 14,0%, respectivamente. Tanto no enraizamento *in vitro* quanto *ex vitro*, segmentos nodais resultaram em maiores porcentagens se comparados às microestacas. Entretanto, mesmo diante das diferenças estatísticas que indicam superioridade dos segmentos nodais de plântula quando comparados às microestacas obtidas de brotações adventícias de microcepas, ambos os explantes se mostraram competentes ao enraizamento *in vitro*. Além disso, considerando que a manutenção dasmicrocepas pode constituir-se de importante estratégia para aumentar a taxa de multiplicação da grápia, estudos devem ser realizados para minimizar estas diferenças.

As concentrações utilizadas de AIB não alteraram a porcentagem de enraizamento *in vitro*, mas favoreceram o enraizamento *ex vitro*. Ajustes são necessários para melhor definir as condições necessárias para o enraizamento *ex vitro* e a aclimatização de plantas de grápia, considerando a menor sobrevivência das plantas se comparado com os valores observados quando o enraizamento realizado *in vitro*. Apesar disso, o enraizamento *ex vitro* pode ser alternativa viável, pois promove o enraizamento concomitantemente à aclimatização, resultando em uma pré-seleção dos materiais genéticos e plantas aptas ao plantio a campo mais rapidamente.

Aliados às pesquisas de propagação vegetativa, os estudos sobre a diversidade genética, especialmente de espécies em risco de extinção, são importantes por fornecer indícios de como os recursos genéticos dessa espécie estão distribuídos nos remanescentes florestais e auxiliar na definição da estratégia mais adequada para o resgate e manutenção da variabilidade genética.

Apesar de ter sido utilizado um conjunto de plantas relativamente restrito, esses resultados permitem uma análise preliminar da diversidade genética e evidenciam a ampla base genética disponível da espécie em estudo. Foi observada elevada porcentagem de fragmentos polimórficos (81,7%) por meio de marcadores de DNA associada à diversidade entre os genótipos de grápia, especialmente quando comparada a outras espécies da mesma família. Essa informação é corroborada por um estudo realizado em nove populações de grápia utilizando sistemas isoenzimáticos que indicam elevada variabilidade genética (STEINER, 2014).

A fragmentação florestal que ocorre em virtude dos cortes seletivos em busca da madeira valiosa causa a redução das populações naturais de grápia e a formação de subpopulações, o que poderá acarretar em erosão genética por efeito de deriva genética, em longo prazo. Entretanto, apesar disso e da iminência de extinção da natureza, foi observada a manutenção de elevada variabilidade genética. Steiner (2014) sugere que a *A. leiocarpa* tenha uma boa capacidade para se restabelecer em ambientes fragmentados e recuperar níveis de heterozigosidade com o passar de gerações.

Também foi possível a identificação de alelos raros, entretanto existe a possibilidade de alelos que estejam em baixa frequência serem perdidos ao longo das gerações, caso não ocorra a articulação de ações de conservação dos remanescentes florestais, pressuposição corroborada por Steiner (2014).

Os resultados indicaram boa adequação metodológica nas análises genéticas, tanto para a extração e obtenção de DNA em quantidade e qualidade satisfatória, por meio de amostras foliares de plantas de grápia, quanto para as reações de amplificação do PCR-RAPD. Assim, os marcadores RAPD podem ser utilizados em futuros estudos genéticos. Os resultados deste estudo sugerem que os 61 fragmentos polimórficos obtidos de 11 iniciadores RAPD selecionados para grápia foram eficientes para quantificar a similaridade genética, pois o dendrograma gerado agrupou os genótipos com alta confiabilidade.

Além disso, a identificação de iniciadores que revelem bandas monomórficas podem representar fragmentos conservados no genoma de grápia e servirem como base para estudos de sequenciamento. Informações desse tipo podem servir para a definição de iniciadores específicos para esta espécie, norteando novos trabalhos de bases moleculares e com um maior grau de informação.

Diante dos resultados obtidos, uma possibilidade que concerne às perspectivas futuras é a organogênese indireta e a embriogênese somática. A capacidade morfogênica dos cultivos *in vitro* foi expressiva, sendo observada a formação de brotos e raízes nos calos, entretanto, não se dispõe de evidências concretas para afirmar se a formação de órgãos adventícios se deu por organogênese ou por embriogênese somática. A possibilidade de ocorrência de embriogênese somática pode indicar o caminho de desenvolvimento de tecnologia para a produção de mudas de grápia por meio de sementes sintéticas.

Apesar da cultura de tecidos envolver altos custos de produção, as informações obtidas nesta pesquisa podem subsidiar novas vertentes de propagação vegetativa, a exemplo da microestaquia e miniestaquia. A miniestaquia possui a vantagem de não necessitar de estruturas laboratoriais e possibilitar a viabilidade econômica da produção massal de mudas, contribuindo para avanços almejados para a silvicultura de espécies nativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, L. B. **Propagação assexuada de araçazeiro**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 53 f. 2011.

ANDRADE, M. W.; et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodrun urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por Microestaquia. In: Reunião técnica de propagação vegetativa, 11., Reunião de silvicultura clonal, 1., 1996, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBS, 1996. p.1-9.

ASSIS, T. F. et al. Propagação por miniestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1992. p.824-836.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A. Análise do cariótipo de *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr. **Ciência Rural**, v. 29, n.1, p. 167-169, 1999.

BACKES, P.; IRGANG, B. 2004. **Mata Atlântica. As árvores e a paisagem**. Porto Alegre, Paisagem do Sul. 396p.

BECKMANN, M. Z.; et al. Marcador *f*AFLP na identificação da diversidade genética de mini-roseiras. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 139-144, 2006.

BEZERRA, R. M. de F. et al. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, v.38, n.5, p.771-778, 2014.

BISOGNIN, D. A. Breeding vegetatively propagated horticultural crops. Croop Breeding and Applied Biotechnology, p. 35-43, 2011.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 6 ed. Viçosa, Ed: UFV, 523 p. 2013.

BOTSTEIN, D.; et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRAMMER, S. P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. **Embrapa**. Documento Online. 12 p. 2000.

BRANCALION, S. P H.; ISERNHAGEN, I; GANDOLFI, S.; RODRIGUES, R. R. Plantio de árvores nativas brasileiras fundamentada na sucessão florestal. In: RODRIGUES, R. R.; BRANCALION, S. P. H; ISERNHAGEN, I. **Pacto pela restauração da mata atlântica**: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal. ERF/ESALQ: Instituto Bio Atlântica, São Paulo, 2009. 256p.

CAIXETA, E. T.; et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 371-442.

CALDAS, L. S.; et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A. L.; et al. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: ASCTP/Embrapa-CNPQ, 1998. p. 89-164.

CARVALHO, J. M. F. C.; et al. **Embriogênese somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 35 p. (Embrapa Algodão. Documento, 152).

CARVALHO, A. de S.; et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 75, p. 402-408, 2015.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1, 1039 p.

CID. L. P. B.; TEIXEIRA. J. B. **Cultura *in vitro* de plantas**. Pedro Barrueto Cid. Editor técnico. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológica, p. 303, 2010.

CNCFLORA. Centro Nacional de Conservação da Flora. Lista Vermelha. Disponível em: http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Dalbergia%20nigra. Acesso em: dez. 2015.

COSTA, F. H. S.; et al. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 39, n. 3, p. 742-748, 2008.

DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. Seleção recorrente em plantas autógamas. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL, 1999, p. 271-281.

DUTRA, L. F.; et al. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.58, p.49-59, 2009.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento in vitro de plantas de macieira (Malus domestica Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; et al. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L.F.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Ocidental. **Scientia Forestales**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p.4 27-435, 2009.

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

FICK, T. A. **Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (Louro-pardo)**. 2007. 61 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

FIGLIOLIA, M. B. Colheita de sementes. In: SILVA, A.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M. B. **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1995. p.1-12. Série Registros, 14.

FILIPPI, M.; et al. Fenologia, morfologia e análise de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 477-491, jul.-set., 2012.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2º Edição. Ribeirão Preto: Funpec-RP. 2002. 631 p. 2002.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Apomixia: um método alternativo para a produção de sementes em plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**. v. 6, n.1, p. 157-170. 2000.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, 2 nd Edition, v.2, 1996.

GIRARDI, C. G.; PESCADOR, R. Aclimatação de gengibre (Zingiber officinale Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 62-72, 2010.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: [sn], p. 175-200. 2007.

GUI-FERREIRA, A.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

GUNN, C. R. Fruits and seeds of genera in the subfamily Caesalpinioideae (Fabaceae). **United States Department of Agriculture**, Technical Bulletin 1755, v. 1, 1991. 408p.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: Brow, A. H. D.; Clegg, M. T.; Kahler, A. L.; Weir, B. S. (Ed.) **Plant population genetics, breeding and genetic resources**, Sunderland: Sinauer Associates Inc. pp. 43-63. 1989.

HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A.; NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**. v. 107/108, p. 281-297. 1993.

HARTMANN, H. T.; et al. **Plant propagation**: principles and practices. 8ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

HEBERLE, M. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel)**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

HERINGER, E. P., FERREIRA, M. B. Árvores úteis da Região Geo-Econômica do Distrito Federal. **Cerrado**, Brasília, v. 19, p. 20-24, 1973.

HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae).** 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

HORBACH, M. A. et al. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n1, p. 113-119, 2011.

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

IACONA, C.; MULEO, R. Light quality affects *in vitro* adventitious rooting and *ex vitro* performance of cherry rootstock colt. **Scientia Horticulturae**, v.125, p.630-636, 2010.

JOSHI, M.; DESHPANDE, J. D. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. **International Journal of Biomedical Research**, v. 1, n. 5, 81-97, 2010.

JUCHUM, F.S.; et al. Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) using RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 3, p. 543-553, 2007.

KAGEYAMA, P. Y., et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 93-107, 2003.

KEVIN, K.; et al. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 657-669, May 2004.

KLEIN, R. M. Contribuição à identificação de árvores nativas nas florestas do sul do Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1982, Campos do Jordão. **Anais**... São Paulo: Instituto Florestal, 1982. p. 421-440. Publicado na Silvicultura em São Paulo, v. 16 A, parte 1, 1982.

KLEIN, R. M. **Meliáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1984. 138p.

KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of Solanum tuberosum *in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, Alexandria, v.27, p.1312-1314, 1992.

LANDO, A. P.; DORIGON, E. B. Emissão de brotos em germinação de *Apuleia leiocarpa* Vog. Macbride, com a utilização de extratos de *Cyperus rotundus* L. e *Saintpaulia ionantha Wendl.* Para uso em miniestaquia. **Unoesc & Ciência** – ACBS, Joaçaba, v. 3, n. 1, p. 47-56, jan./jun. 2012.

LEITZKE, L. N.; et al. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

LELES, P.S. dos S.; et al. Comportamento de garapa (*Apuleia leiocarpa*) e jatobá (*Hymenaea courbaril*) plantadas a pleno sol e sob linhas de enriquecimento em mata secundária degradada, no Município de Cardoso Moreira, Estado do Rio de Janeiro. In: SIMPÓSIO NACIONAL RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 4., 2000, Blumenau. Silvicultura ambiental: trabalhos voluntários: **Anais**... Blumenau: FURB / SOBRADE, 2000. p.58.

LENCINA, K. H**. Germinação e multiplicação in vitro de grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.).** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 91 p. 2013.

LENCINA, K. H.; et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grápia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.6, p.1025-1030, jun, 2014.

LEÓN, E. A. B. **Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese in vitro em explantes de açoita cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)**. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed., v.1, Nova Odessa: Plantarum, 2002. 368p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Sistematics.** v.15. p.65-95, 1984.

MAIXNER, A. E.; FERREIRA, L. A. B. Contribuição ao estudo das essências florestais e frutíferas nativas no Estado do Rio Grande do Sul. **Trigo e Soja**, Porto Alegre, n. 18, p. 3-20, 1976.

MALOSSO, M. G.; et al. S. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Jacaranda decurrens* Cham. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 6, n. 7, p. 1147-1154, 2012.

MARQUARDT, P. E.; EPPERSON, B. K. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 11, p. 3305-3315, Nov. 2004.

MATTOS, N. F.; GUARANHA, J. **Contribuição ao estudo da grápia**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis "AP", 1983. 27p. (Publicação IPRNR, 12).

MENDONÇA FILHO, C.V. **Braúna, angico, jacarandá e outras leguminosas de mata Atlântica**. Fundação Botância Margaret Mee/ Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte. 100p. 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Phisiology Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de métodos de escarificação na superação da dormência de sementes e de substratos na germinação e no desenvolvimento da grápia (*Apuleia leiocarpa*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 419-424, 1997.

OLIVEIRA, L. S. de; et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out./dez. 2013.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in vitro culture – A review. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 155-163, Dec. 1998.

PASA, M. et al. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.8, p.1392-1396, 2012.

PELEGRINI, L. L.; et al. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 9, p. 1527-1523, 2011.

PEREIRA, T. S. et al. Fenologia de espécies arbóreas em Floresta Atlântica da Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, Serie Botânica, Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 329-339, jul/ dez. 2008.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de Eucalyptus urophylla S. T. Blake. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 60, p. 135-148, dez. 2001.

RAVEN, P. H.; et al. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Trad. de Ana Cláudia de Macedo Vieira et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 172-175.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil:** manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Blücher, 1971. 294 p.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998, p. 329-380.

SAADAT, Y. A.; HENNERTY, M. J. Factors affecting the multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 251-260, 2002.

SAMPAIO, P. de T. B.; VENTURIERI, G. A. Variação genética entre e dentro de progênies de quatro espécies de leguminosas: *Copaifera muttijuqe* Hayne; *Hymenaea courbaril* Linn.;

Apuleia leiocarpa e *Hymenolobium* sp. Silvicultura, São Paulo, n. 42, t. 3, p. 633-635, 1990. Congresso Florestal Brasileiro, **Anais...**, Campos do Jordão, 1990.

SATO, A., Y.; et al. Micropropagação de *Celtis sp*: controle da contaminação e oxidação**.** **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123. 2001.

SCREMIN-DIAS, E.; et al. **Produção de mudas de espécies florestais nativas**: Manual 1. Campo Grande: Ed. UFMS (Rede de sementes do Pantanal), 2006. 43 p.

SEOANE, C.E.S.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 57, p. 123-139, 2000.

SILVA, P. H. M.; et al. Indicadores estatísticos sobre viveiros florestais no Brasil. **IPEF**, Piracicaba, 2008.

SILVA, L.N.; et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology,** n. 53, v. 3, p. 464-468, 2014.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of the Society of Experimental Biology**, v. 11, p. 118-130, 1957.

SKREBSKY, E. C.; et al. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, 2006.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A. Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. São Carlos: **RiMa**: Novo Ambiente, 350 p. 2006.

STEINER, F. **Diversidade genética e análise da paisagem de espécies arbóreas da floresta Estacional Decidual**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis. 152 p. 2014.

TABARELLI, M. Flora arbórea da floresta estacional baixo-montana no Município de Santa Maria-RS, Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, 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**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TEIXEIRA, D. do A. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem (*Puccinia psidii*) e à mancha de *Cylindrocladium candelabrum* mediadas por rizobactérias em *Eucalyptus* spp**. Tese (Doutorado em Agronomia - Fitopatologia) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV. 2001.

THORPE, T.A., et al. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation**: techonology and aplication. Dordrcht: Kluwer, 1991. p.311-336.

VACCARO, S.; et al. 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**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 1-18, 1999.

WANG, Q.; ANDERSON, A. S. Propagation of Hibiscus rosa-sinensis: relations between stock plant, age, environment and growth regulator treatments. **Acta Horticulture**, Wageningen, n. 227, p. 167-169, 1988.

WENDLING, I. et al. Miniestacas de origem juvenil e adulta e concentrações de ácido indolbutírco na miniestaquia de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: Congreso Sudamericano de la yerba mate, 4, Misiones. **Anais...** Misiones, Argentina. 2006.

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

WERNER, E.T.; et al. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v. 33, p. 987-996. 2009.

WILLIAMS, J. G. K.; et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, n. 18, p. 6531–6535, 1990.

XAVIER, A.; et al. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

ZANETTI, M.; et al. Características físicas de substratos para a produção de mudas cítricas sob telado. **Laranja**, Cordeirópolis, v.24, n.2, p.519-530, 2003.

ZHANG, L.; et al. Factor sinfluencing shoots regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* F. ***In vitro*-Plant**, New York, v. 39, p. 459-462, 2003.

ZHOU, Y. et al. Enzymes Associated with Blackhe art Development in Pineapple Fruit. **Food Chem**, n. 80, p. 565-572, 2003.

APENDICES

Apêndice 1 - Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência das microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FASES DE CULTIVO	1	169.5831	42.3958	0.5215 NS
BAP	4	49.7302	49.7302	0.6117 NS
FASES DE CULTIVO X BAP	4	356.7704	89.1926	1.0971 NS
TRATAMENTO	9	576.0836	64.0093	
RESÍDUO	40	3252.0044	81.3001	

Apêndice 2 - Resumo da análise de variância para porcentagem de brotação das microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FASES DE CULTIVO	1	169.5831	42.3958	0.5215 NS
BAP	4	49.7302	49.7302	0.6117 NS
FASES DE CULTIVO X BAP	4	356.7704	89.1926	1.0971 NS
TRATAMENTO	9	576.0836	64.0093	
RESÍDUO	40	3252.0044	81.3001	

Apêndice 3 – Resumo da análise de variância para número de brotos formados microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FASES DE CULTIVO	1	0.0791	0.0791	2.6680 NS
BAP	4	0.5291	0.1323	4.4591 **
FASES DE CULTIVO X BAP	4	0.1294	0.0324	1.0907 NS
TRATAMENTO	9	0.7377	0.0820	
RESÍDUO	40	1.1866	0.0297	

Apêndice 4 – Resumo da análise de variância para o comprimento dos brotos formados microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FASES DE CULTIVO	1	9.8859	9.8859	338.6599 **
BAP	4	0.0715	0.0179	0.6125 NS
FASES DE CULTIVO X BAP	4	0.1310	0.0328	1.1220 NS
TRATAMENTO	9	10.0884	1.1209	

RESÍDUO	40	1.1676	0.0292

Apêndice 5 – Resumo da análise de variância para número de microestacas por broto formado nas microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FASES DE CULTIVO	1	1.1411	1.1411	32.2731 **
BAP	4	0.1330	0.0333	0.9405 NS
FASES DE CULTIVO X BAP	4	0.1542	0.0386	1.0905 NS
TRATAMENTO	9	1.4283	0.1587	
RESÍDUO	40	1.4143	0.0354	

Apêndice 6 – Resumo da análise de variância para número de microestacas por microcepas de grápia cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante 30 dias de cultivo inicial e subcultivadas por mais 30 dias em meio de cultura livre de citocinina.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FASES DE CULTIVO	1	3.5292	3.5292	49.7515 **
BAP	4	0.5173	0.1293	1.8230 NS
FASES DE CULTIVO X BAP	4	0.0480	0.0120	0.1691 NS
TRATAMENTO	9	4.0944	0.4549	
RESÍDUO	40	2.8374	0.0709	

Apêndice 7 – Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
COLETAS	2	34.6777	17.3389	0.9438 NS
MEIO DE CULTURA	2	40.8783	20.4392	1.1125 NS
CARVÃO ATIVADO	1	54.8010	54.8010	2.9828 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA	4	34.9937	8.7484	0.4762 NS
COLETAS X CARVÃO ATIVADO	2	34.6777	17.3389	0.9438 NS
MEIO DE CULTURA X CARVÃO	2	40.8783	20.4392	1.1125 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA X CARVÃO ATIVADO	4	34.9937	8.7484	0.4762 NS
TRATAMENTO	17	275.9005	16.2294	
RESÍDUO	162	2976.3131	18.3723	

Apêndice 8 – Resumo da análise de variância para brotação das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
COLETAS	2	40.5624	20.2812	1.0800 NS
MEIO DE CULTURA	2	40.5624	20.2812	1.0800 NS
CARVÃO ATIVADO	1	60.8436	60.8436	3.2400 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA	4	162.2496	40.5624	2.1600 NS
COLETAS X CARVÃO ATIVADO	2	40.5624	20.2812	1.0800 NS
MEIO DE CULTURA X CARVÃO	2	40.5624	20.2812	1.0800 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA X CARVÃO ATIVADO	4	162.2496	40.5624	2.1600 NS
TRATAMENTO	17	547.5923	32.2113	
RESÍDUO	162	3042.1796	18.7789	

Apêndice 9 - Resumo da análise de variância para número de brotos das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
COLETAS	2	0.6147	0.3073	10.2173 **
MEIO DE CULTURA	2	0.2952	0.1476	4.9065 **
CARVÃO ATIVADO	1	1.3736	1.3736	45.6616 **
COLETAS X MEIO DE CULTURA	4	0.0799	0.0200	0.6640 NS
COLETAS X CARVÃO ATIVADO	2	0.1162	0.0581	1.9313 NS
MEIO DE CULTURA X CARVÃO	2	0.0282	0.0141	0.4680 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA X CARVÃO ATIVADO	4	0.2138	0.0534	1.7767 NS
TRATAMENTO	17	2.7215	0.1601	
RESÍDUO	162	4.8732	0.0301	

Apêndice 10 - Resumo da análise de variância para comprimento dos brotos das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
COLETAS	2	11.5679	5.7840	306.9462 **
MEIO DE CULTURA	2	0.1665	0.0832	4.4176 *
CARVÃO ATIVADO	1	3.1207	3.1207	165.6096 **
COLETAS X MEIO DE CULTURA	4	0.1791	0.0448	2.3757 NS
COLETAS X CARVÃO ATIVADO	2	0.0218	0.0109	0.5780 NS
MEIO DE CULTURA X CARVÃO	2	0.1093	0.0547	2.9015 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA X CARVÃO ATIVADO	4	0.1405	0.0351	1.8643 NS
TRATAMENTO	17	15.3058	0.9003	
RESÍDUO	162	3.0527	0.0188	

Apêndice 11 - Resumo da análise de variância para número de microestacas por broto das microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F

COLETAS	2	6.0711	3.0356	113.6877 **
MEIO DE CULTURA	2	0.0790	0.0395	1.4798 NS
CARVÃO ATIVADO	1	2.3352	2.3352	87.4592 **
COLETAS X MEIO DE CULTURA	4	0.3136	0.0784	2.9362 *
COLETAS X CARVÃO ATIVADO	2	0.3822	0.1911	7.1567 **
MEIO DE CULTURA X CARVÃO	2	0.1251	0.0626	2.3431 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA X CARVÃO ATIVADO	4	0.4190	0.1047	3.9227 **
TRATAMENTO	17	9.7253	0.5721	
RESÍDUO	162	4.3256	0.0267	

Apêndice 12 - Resumo da análise de variância para número de microestacas por microcepas de grápia cultivadas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados em três coletas.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
COLETAS	2	10.9511	5.4755	41.7653 **
MEIO DE CULTURA	2	0.1733	0.0867	0.6611 NS
CARVÃO ATIVADO	1	0.8891	0.8891	6.7820 **
COLETAS X MEIO DE CULTURA	4	1.7428	0.4357	3.3234 *
COLETAS X CARVÃO ATIVADO	2	4.1969	2.0984	16.0061 **
MEIO DE CULTURA X CARVÃO	2	0.5435	0.2718	2.0729 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA X CARVÃO ATIVADO	4	2.2126	0.5531	4.2192 **
TRATAMENTO	17	20.7093	1.2182	
RESÍDUO	162	21.2386	.1311	

Apêndice 13 - Resumo da análise de variância para porcentagem de calo em microcepa de grápia mantidas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados durante em três coletas.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
COLETAS	2	122.6633	61.3316	1.7081 NS
MEIO DE CULTURA	2	895.5483	447.7741	12.4708 **
CARVÃO ATIVADO	1	296948.0926	296948.092	8270.1806 **
COLETAS X MEIO DE CULTURA	4	1791.0965	447.7741	12.4708 **
COLETAS X CARVÃO ATIVADO	2	1900.2862	950.1431	26.4620 **
MEIO DE CULTURA X CARVÃO	2	6.7368	3.3684	.0938 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA X CARVÃO ATIVADO	4	13.4735	3.3684	.0938 NS
TRATAMENTO	17	301677.8972	17745.7587	
RESÍDUO	162	5816.7522	35.9059	

Apêndice 14 - Resumo da análise de variância para calos com a formação de brotações por organogênese indireta em microcepa de grápia mantidas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados durante em três coletas.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F

COLETAS	2	33281.9454	16640.9727	78.2253 **
MEIO DE CULTURA	2	381.6173	190.8087	0.8969 NS
CARVÃO ATIVADO	1	115714.9136	115714.9136	543.9486 **
COLETAS X MEIO DE CULTURA	4	571.7045	142.9261	0.6719 NS
COLETAS X CARVÃO ATIVADO	2	37058.6891	18529.3445	87.1021 **
MEIO DE CULTURA X CARVÃO	2	73.4642	36.7321	0.1727 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA X CARVÃO ATIVADO	4	191.7519	47.9380	0.2253 NS
TRATAMENTO	17	187274.0860	11016.1227	
RESÍDUO	162	34462.4768	212.7313	

Apêndice 15 - Resumo da análise de variância para porcentagem de oxidação em microcepa de grápia mantidas em diferentes meios de cultura suplementados ou não com carvão ativado e avaliados durante em três coletas.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
COLETAS	2	31926.1359	15963.0679	104.6402 **
MEIO DE CULTURA	2	919.5972	459.7986	3.0140 NS
CARVÃO ATIVADO	1	147248.9530	147248.9530	965.2378 **
COLETAS X MEIO DE CULTURA	4	625.7880	156.4470	1.0255 NS
COLETAS X CARVÃO ATIVADO	2	31926.1359	15963.0679	104.6402 **
MEIO DE CULTURA X CARVÃO	2	919.5972	459.7986	3.0140 NS
COLETAS X MEIO DE CULTURA X CARVÃO ATIVADO	4	625.7880	156.4470	1.0255 NS
TRATAMENTO	17	214191.9951	12599.5291	
RESÍDUO	162	24713.4223	152.5520	

Apêndice 16 – Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de segmentos nodais e microestacas de apuleia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPO DE EXPLANTE	1	708.0720	708.0720	5.9779 *
CONCENTRAÇÃO DE AIB	4	375.3890	93.8473	0.7923 NS
EXPLANTE X AIB	4	200.4475	50.1119	0.4231 NS
TRATAMENTO	9	1283.9085	142.6565	
TOTAL	60	7106.9003	118.4483	

Apêndice 17 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento de segmentos nodais e microestacas de apuleia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPO DE EXPLANTE	1	2652.2598	2652.2598	8.0636 **
CONCENTRAÇÃO DE AIB	4	713.0173	178.2543	0.5419 NS
EXPLANTE X AIB	4	1531.7152	382.9288	1.1642 NS
TRATAMENTO	9	4896.9923	544.1103	
TOTAL	60	19734.9344	328.9156	

Apêndice 18 – Resumo da análise de variância para o número raízes formadas em segmentos nodais e microestacas de grápia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPO DE EXPLANTE	1	0.0029	0.0029	0.0290 NS
CONCENTRAÇÃO DE AIB	4	0.8825	0.2206	2.1931 NS
TRATAMENTO	9	3.0835	0.3426	
TOTAL	68	6.8409	0.1006	

Apêndice 19 – Resumo da análise de variância para o comprimento das raízes (cm) formadas em segmentos nodais e microestacas de apuleia cultivados por 60 dias em meio de cultura WPM acrescidos de diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TIPO DE EXPLANTE	1	7.2469	7.2469	23.2997 **
CONCENTRAÇÃO DE AIB	4	4.2206	1.0552	3.3924 *
EXPLANTE X AIB	4	11.1773	2.7943	8.9841 **
TRATAMENTO	9	22.6449	2.5161	
TOTAL	68	21.1501	0.3110	

Apêndice 20 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência de plantas de grápia enraizadas *in vitro* e aclimatizadas por 30 dias em sala de crescimento.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
SUBSTRATO	1	1119.6928	1119.6928	2.95 NS
RESÍDUO	14	5308.3147	379.1653	
TOTAL	15	6428.0075		

Apêndice 21 – Resumo da análise de variância para o altura da parte aérea (cm) de plantas de grápia enraizadas *in vitro* e aclimatizadas por 30 dias em sala de crescimento.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
SUBSTRATO	1	0.0018	0.0018	0.05 NS
RESÍDUO	14	0.5305	0.0379	
TOTAL	15	0.5323		

Apêndice 22 – Resumo da análise de variância para o número de folhas em plantas de grápia enraizadas *in vitro* e aclimatizadas por 30 dias em sala de crescimento.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
SUBSTRATO	1	0.4778	0.4778	1.03 NS
RESÍDUO	14	6.4827	0.4630	
TOTAL	15	6.9605		

Apêndice 23 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência de segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
EXPLANTE	1	3726.1487	3726.1487	20.6182 **
SUBSTRATO	2	206.8248	103.4124	0.5722 NS
AIB	1	15.9483	15.9483	0.0882 NS
EXPLANTE X SUBSTRATO	2	667.1530	333.5765	1.8458 NS
EXPLANTE X AIB	1	622.9948	622.9948	3.4473 NS
SUBSTRATO X AIB	2	28.2667	14.1334	0.0782 NS
EXPLANTE X SUBSTRATO X AIB	2	61.2703	30.6352	0.1695 NS
TRATAMENTO	11	5328.6066	484.4188	
RESÍDUO	48	8674.6199	180.7212	

Apêndice 24 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento de segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
EXPLANTE	1	1772.1577	1772.1577	16.5118 **
SUBSTRATO	2	1071.9940	535.9970	4.9941 *
AIB	1	341.5240	341.5240	3.1821 NS
EXPLANTE X SUBSTRATO	2	1347.6210	673.8105	6.2781 **
EXPLANTE X AIB	1	594.6052	594.6052	5.5402 *
SUBSTRATO X AIB	2	170.9668	85.4834	0.7965 NS
EXPLANTE X SUBSTRATO X AIB	2	28.2848	14.1424	0.1318 NS
TRATAMENTO	11	5327.1535	484.2867	
RESÍDUO	48	5151.6741	107.3265	

Apêndice 25 – Resumo da análise de variância para o número de raízes formadas em segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
EXPLANTE	1	0.0351	0.0351	1.1074 NS
SUBSTRATO	2	0.4779	0.2389	7.5431 **
AIB	1	0.5295	0.5295	16.7179 **
EXPLANTE X SUBSTRATO	2	0.0125	0.0063	0.1976 NS
EXPLANTE X AIB	1	2.9084	2.9084	91.8190 **
SUBSTRATO X AIB	2	1.5081	0.7541	23.8058 **
TRATAMENTO	11	7.5485	0.6862	
RESÍDUO	48	1.2987	0.0317	

Apêndice 26 – Resumo da análise de variância para o comprimento de raízes formadas em segmentos nodais e microestacas tratados ou não com ácido indolbutírico (AIB) e cultivados em diferentes substratos por 45 dias em câmara úmida.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
EXPLANTE	1	0.1782	0.1782	2.3108 NS
SUBSTRATO	2	1.0157	0.5079	6.5872 **
AIB	1	0.6798	0.6798	8.8172 **
EXPLANTE X SUBSTRATO	2	0.1500	0.0750	0.9727 NS
EXPLANTE X AIB	1	0.8005	0.8005	10.3826 **
SUBSTRATO X AIB	2	0.7033	0.3517	4.5613 *
TRATAMENTO	11	5.2311	0.4756	
RESÍDUO	48	3.1610	0.0771	