

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PEDRO MIGUEL DOMINGUES DOS SANTOS

**BIOMETRIA, CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA E MULTIPLICAÇÃO *IN*
VITRO DE JEQUITIBÁS-ROSA DO SUL DE MINAS GERAIS**

Alfenas/MG

2016

PEDRO MIGUEL DOMINGUES DOS SANTOS

BIOMETRIA, CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE JEQUITIBÁS-ROSA DO SUL DE MINAS GERAIS

Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Pesquisa: Tecnologias Ambientais Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. Breno Régis Santos.

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Santos, Pedro Miguel Domingues dos.

Biometria, conservação de germoplasma e multiplicação in vitro de
Jequitibás-Rosa do sul de Minas Gerais / Pedro Miguel Domingues dos
Santos. -- Alfenas - MG, 2016.
79 f.

Orientador: Breno Régis Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal
de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. Lecitidacea. 2. Sementes – Colheita. 3. Germinação. 4. Aclimação.
5. Morfogenese. I. Santos, Breno Régis. II. Título.

CDD-571.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1449 (Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



PEDRO MIGUEL DOMINGUES DOS SANTOS

“Biometria, conservação de germoplasma e multiplicação *In vitro* de Jequitibás-rosa do sul de Minas Gerais”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 16 de dezembro de 2016.

Prof. Dr. Breno Régis Santos
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva
Instituição: UNIFENAS

Assinatura: 

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

Dedico à minha irmã e professora Elisabeth, à minha mãe Maria Amândia e ao meu pai Manuel Jaurêta (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Aos Jequitibás-rosa, às abelhas e às serpentes caninanas que se encontravam nas suas copas, por terem permitido as escaladas com segurança.

Ao meu orientador Prof. Dr. Breno Régis Santos, por ter acreditado e participado com dedicação deste projeto.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Aos estagiários da UNIFAL: Felipe Schmidt, Nathan Dourado, Francisco Siqueira e Alexandre Soares, pelo auxílio durante as escaladas dos Jequitibás.

Ao Mestre Lucas de Souza pelos ensinamentos na cultura de tecidos vegetais.

À Dra. Luciene de Oliveira pela ajuda na estatística dos experimentos.

A todos os Professores e Funcionárias do BIOGEN, pelos conhecimentos transmitidos durante a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Vinícius da Silva pela participação na elaboração do artigo.

À minha querida família, no Brasil e em Portugal pelo apoio constante.

Ao Professor e amigo MSc. Marcos Navarro Miliozzi por ter mostrado o caminho e a importância da Educação Ambiental.

A todos os meus amigos, em especial; Gilson e Feninho (*in memoriam*) que me motivaram a escalar e a preservar os gigantes da Mata Atlântica Brasileira.

Serei sempre grato.

Até quando vamos permitir que o nosso modo de vida e a nossa vontade insaciável de consumo de recursos naturais, continue levando espécies de grande importância ambiental à extinção, assim como as outras espécies que dependem delas?

(O autor, 2016)

RESUMO

O jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze), de 30 a 50m de altura é uma das maiores árvores nativas do Brasil. Esta espécie sofre com a fragmentação do habitat e está incluída na lista de espécies em extinção, na categoria vulnerável. Ocorre em um número limitado de habitats naturais, com uma densidade populacional de < 1 árvore/hectare nos fragmentos remanescentes. O objetivo deste estudo foi multiplicar *in vitro* jequitibás-rosa do sul de Minas Gerais, assim como conservar o germoplasma, fazer o estabelecimento *in vitro*, aclimatização e a biometria destes. Foi utilizada a técnica de escalada em árvores para a coleta de explantes, sementes e realizar a biometria. Para a multiplicação *in vitro*, os segmentos nodais foram inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de ANA e BAP. Para a germinação as sementes após desinfestação foram imersas em água destilada diferentes tempos. Após a imersão, estas foram inoculadas em meio MS acrescido com diferentes concentrações de GA₃. As plantas obtidas foram aclimatizadas em vasos de 550 cm³ contendo os diferentes substratos: vermiculita e solo de floresta; sendo posteriormente cobertas com uma garrafa tipo *pet* para evitar a desidratação. Para a indução de calos, segmentos caulinares e os cotiledonares foram inoculados em meio WPM, em diferentes concentrações de ANA e BAP. Durante a coleta dos explantes, foram registradas duas serpentes no jequitibá-rosa, sendo realizadas fotografias e biometria das mesmas. Nos experimentos realizados não ocorreram brotações em segmentos nodais de *Cariniana legalis*, aos 90 dias de cultivo. O melhor tratamento para a germinação foi aquele em que as sementes ficaram imersas em água 48h combinado com 14,45 µM GA₃, obtendo-se 70% das sementes germinadas. As plantas aclimatizadas em substrato solo de floresta aos 120 dias apresentaram a maior percentagem de aumento da parte aérea 103,08%; número de folhas 282,36% e diâmetro 93,76% que as aclimatizadas em vermiculita. A indução de calos (70%) e o aumento da massa fresca (122%) foi mais eficiente em meio WPM contendo 0.54 ANA + 6.66 µM BAP. Foi descrito um encontro agonístico entre dois indivíduos de *Spilotes pullatus* a 31m de altura na copa do jequitibá-rosa, sendo este um registro inédito. Os jequitibás-rosa têm de biometria: DAP entre 1,51 m e 2,80 m; altura total entre 35,70 m e 50,00 m; idades entre 330 e 611 anos. Para indução de calos em *Cariniana legalis* recomenda-se usar explantes cotiledonares cultivados em meio WPM, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e acrescidos com 0.54 µM ANA + 6.66 µM BAP. Desta forma foi possível realizar o estabelecimento *in vitro* do Jequitibá-rosa, a conservação de seu germoplasma na forma de calos, a produção de mudas após a aclimatização, e além do registro inédito das serpentes caninanas em maior altura.

Palavras-chave: *Cariniana legalis*. Escalada. Germinação. Aclimatização. Calogênese.

ABSTRACT

The jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze), 30 to 50m high is one of the largest native trees in Brazil. This species suffers from habitat fragmentation and is included in the list of endangered species in the vulnerable category. Occurs in a limited number of natural habitats, with a population density of <1 tree / hectare in the remaining fragments. The objective of this study was to micropropagate *in vitro* jequitibás-rosa of the south of Minas Gerais, as well as to conserve the germplasm, to make the establishment *in vitro*, acclimatization and the biometry of these. The tree climbing technique was used to collect explants, seeds and perform biometrics. For the *in vitro* micropropagation, the nodal segments were inoculated in WPM medium with different concentrations of ANA and BAP. For germination the seeds after disinfestation were immersed in distilled water at different times. After immersion, these were inoculated in MS medium supplemented with different concentrations of GA3. The plants obtained were acclimatized in pots of 550 cm³ containing the different substrates: vermiculite and forest soil; being later covered with a pet-type bottle to avoid dehydration. For callus induction, stem segments and cotyledons were inoculated in WPM medium at different concentrations of ANA and BAP. During the collection of the explants, two snakes were recorded in the jequitibá-rosa, being carried out photographs and biometrics of the same. In the experiments carried out there were no shoots in nodal segments of *Cariniana legalis*, at 90 days of cultivation. The best treatment for germination was the one in which the seeds were immersed in water 48h combined with 14.45 µM GA3, obtaining 70% of the seeds germinated. The acclimatized plants on substrate forest soil at 120 days presented the highest percentage of aerial part increase 103.08%; Number of leaves 282.36% and diameter 93.76% than those acclimatized in vermiculite. Callus induction (70%) and fresh mass increase (122%) were more efficient in WPM medium containing 0.54 ANA + 6.66 µM BAP. It was described an agonistic encounter between two individuals of *Spilotes pullatus* at 31m height in the crown of the jequitibá-rosa, this being the first record. The jequitibás-rosa have biometrics: DAP between 1.51 m and 2.80 m; Total height between 35,70 m and 50,00 m; ages between 330 and 611 years. For callogenesis induction in *Cariniana legalis* it is recommended to use cotyledonary explants cultivated in WPM medium, plus 30 g L⁻¹ sucrose and added with 0.54 µM ANA + 6.66 µM BAP. In this way it was possible to establish *in vitro* the Jequitibá-rosa, the conservation of its germplasm in the form of callus, the production of plants after acclimatization, and besides the first report of the caninana snakes in greater height.

Key-words: *Cariniana legalis*. Climbing. Germination. Acclimatization. Calogenesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE.....	12
2.2	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	13
2.3	IMPORTÂNCIA AMBIENTAL.....	15
2.4	IMPORTÂNCIA HISTÓRICA, SOCIAL E ECONÔMICA.....	15
2.5	SEMENTES E GERMINAÇÃO.....	17
2.6	PROPAGAÇÃO VEGETATIVA.....	17
2.6.1	Micropropagação <i>in vitro</i>	18
2.7	DESCRIÇÃO DA <i>Spilotus pullatus</i>	19
3	METODOLOGIA	20
3.1	LOCAIS DE ESTUDO E COLETA DE GERMOPLASMA.....	20
3.2	BIOMETRIA E ESTIMATIVA DE IDADE.....	22
3.3	ESCALADA E COLETA DE GERMOPLASMA	23
3.4	MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	26
3.5	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	27
3.5.1	Germinação <i>in vitro</i> de sementes coletadas no solo	27
3.5.2	Padronização de retirada de sementes e desinfestação, para frutos coletados na copa das árvores	28
3.5.3	Germinação <i>in vitro</i> de sementes coletadas na copa dos Jequitibás-rosa	29
3.6	ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DAS PLANTAS	31
3.7	CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA	32
3.7.1	Indução de calos	32
3.8	REGISTRO DA <i>Spilotus pullatus</i>	34
4	RESULTADOS e DISCUSSÃO	35
4.1	BIOMETRIA E ESTIMATIVA DE IDADE	35
4.2	MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	37
4.3	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	37
4.3.1	Germinação <i>in vitro</i> de sementes coletadas no solo	38

4.3.2	Germinação <i>in vitro</i> de sementes coletadas na copa dos Jequitibás-rosa	38
4.4	ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DAS PLANTAS	41
4.5	CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA	45
4.5.1	Indução de calos	45
4.6	REGISTRO DA <i>Spilotus pullatus</i>	48
	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	56
	ANEXO A - Artigo submetido à Revista Herptology Notes.....	56
	ANEXO B - Autorização do SISBIO para coleta de material vegetal.....	78
	ANEXO C - Análise de solo do jequitibá-rosa da Divisa Nova.....	79

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores diversidades arbóreas do mundo, sendo que mais de 50% das espécies nativas se encontram na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica. Desta última só restam 7,26% da sua cobertura original devido à ocupação urbana, avanço das fronteiras agrícolas, falta de direcionamento técnico e conscientização ecológica na exploração dos recursos florestais. Deste modo espécies de grande valor; ambiental, histórico, econômico e social estão em vias de extinção, assim como a fauna e flora que depende destas espécies, também corre perigo (LORENZI, 2008; PILATTI et al., 2010).

Uma das espécies que sofreu com a intensa exploração madeireira e o corte seletivo é a *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, que está incluída na lista de espécies em extinção, na categoria vulnerável, ocorrendo em um número limitado de habitats naturais, com uma densidade populacional de < 1 árvore/hectare (IUCN, 2012; LEAL; SANTOS; GAIOTTO, 2014).

No Brasil a propagação do jequitibá rosa é feita por sementes, o que limita a disponibilidade de suas mudas e o repovoamento desta espécie. Desta forma a propagação vegetativa é uma alternativa viável para a produção de mudas que associada a programas de melhoramento genético, tem como finalidade acelerar o crescimento, aumentar a produtividade e gerar madeira de qualidade homogênea, por meio da multiplicação das plantas selecionadas (ALFENAS et al., 2004).

A propagação vegetativa ou assexuada surgiu como uma alternativa à produção sexuada. Ela é de grande importância quando se pretende multiplicar um genótipo que é heterozigoto e que apresenta características consideradas superiores, que se perdem quando propagadas por sementes (GATTI, 2002).

A multiplicação de plantas por meio da propagação vegetativa engloba vários métodos: estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação *in vitro* (XAVIER et al., 2009). A estaquia é a técnica mais conhecida para a clonagem de árvores, o que permitiu o desenvolvimento da silvicultura clonal intensivamente em várias partes do mundo e sendo responsável pelos maiores avanços tecnológicos na área florestal.

A multiplicação clonal permite a manutenção das características da planta-mãe, de modo a obter estandes uniformes de crescimento rápido e produção de matéria prima homogênea, o que possibilita a implantação de genótipos silviculturais e tecnologicamente superiores e resistentes a doenças (ALFENAS et al., 2009). Torna-se necessário à sua

implantação em áreas de preservação ambiental, parques e praças públicas, pois tem um grande potencial paisagístico e servem como árvores matrizes para bancos de germoplasma (VIEIRA, 1990).

A redução do tamanho das populações, pode causar perda dos alelos e reduzir a heterozigosidade que juntamente com a redução da dispersão do pólen e sementes provocada pelos efeitos da fragmentação, isola as populações genética e demograficamente causando a extinção local da espécie (LEAL; SANTOS; GAIOTTO, 2014).

Alguns indivíduos gigantes de jequitibá-rosa, isolados do fragmento florestal, localizados em áreas de pastagem ou plantações de café, não estão produzindo sementes todos os anos, como é o caso do jequitibá-rosa da fazenda chapéu de Sol em Paraguaçu-MG. Desta forma, um dos modos de preservar o genótipo destes indivíduos é por meio da multiplicação *in vitro*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi multiplicar *in vitro* cinco (5) dos maiores indivíduos de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze) do sul de Minas Gerais, assim como conservar o germoplasma, fazer o estabelecimento *in vitro*, aclimatizar e fazer a biometria dos jequitibás.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O jequitibá-rosa é uma das maiores árvores do Brasil, a sua densidade nos fragmentos remanescentes e nas áreas de preservação ambiental é cada vez menor. A espécie deve ser preservada, porque possui grande importância: ambiental; histórica; social; econômica e medicinal.

2.1 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE

A espécie *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, popularmente conhecida como jequitibá-rosa pertencente à família *Lecythidaceae*. São árvores semidicíduas, heliófitas, comumente com 30 a 50m de altura, tronco de 70 a 100 cm de diâmetro, vertical e cilíndrico, revestido por casca pardacenta e fissurada (LORENZI, 2008) (Figura 1).

É uma planta característica da floresta clímax, é rara no cerrado ou em terrenos mais secos. Possui tolerância moderada a luz solar durante os primeiros anos e o seu crescimento varia de moderado a rápido atingindo 2 m de altura em 2 anos (LORENZI, 2008; RÊGO, 2001).

Na Mata Atlântica Brasileira, a *Cariniana legalis* é considerada a espécie de árvores mais alta segundo Tambarussi et al. (2015), alcançando mais de 60 m de altura e 4 m de diâmetro à altura do peito; sendo uma das maiores e mais longevas árvores dos biomas neotropicais podendo ultrapassar 500 anos de idade (CARVALHO, 2005; GUIDUGLI et al., 2010).

Floresce durante os meses de dezembro-fevereiro, flores pequenas, cremes, dispostas em panículas axilares e apicais (Figura 1). As suas flores são hermafroditas e polinizadas por abelhas.

O fruto é do tipo pixído, lenhoso, começa a ser produzido a partir dos 20 anos de idade e a sua maturação ocorre no período agosto-setembro (CARVALHO, 2006; RÊGO; POSSAMAI, 2001). Para obtenção de sementes os frutos devem ser colhidos diretamente da árvore quando iniciarem a abertura espontânea, depois devem ficar ao sol para completar a abertura e liberarem as sementes. A dispersão das sementes é zoocórica e anemocórica (CARVALHO, 2005).

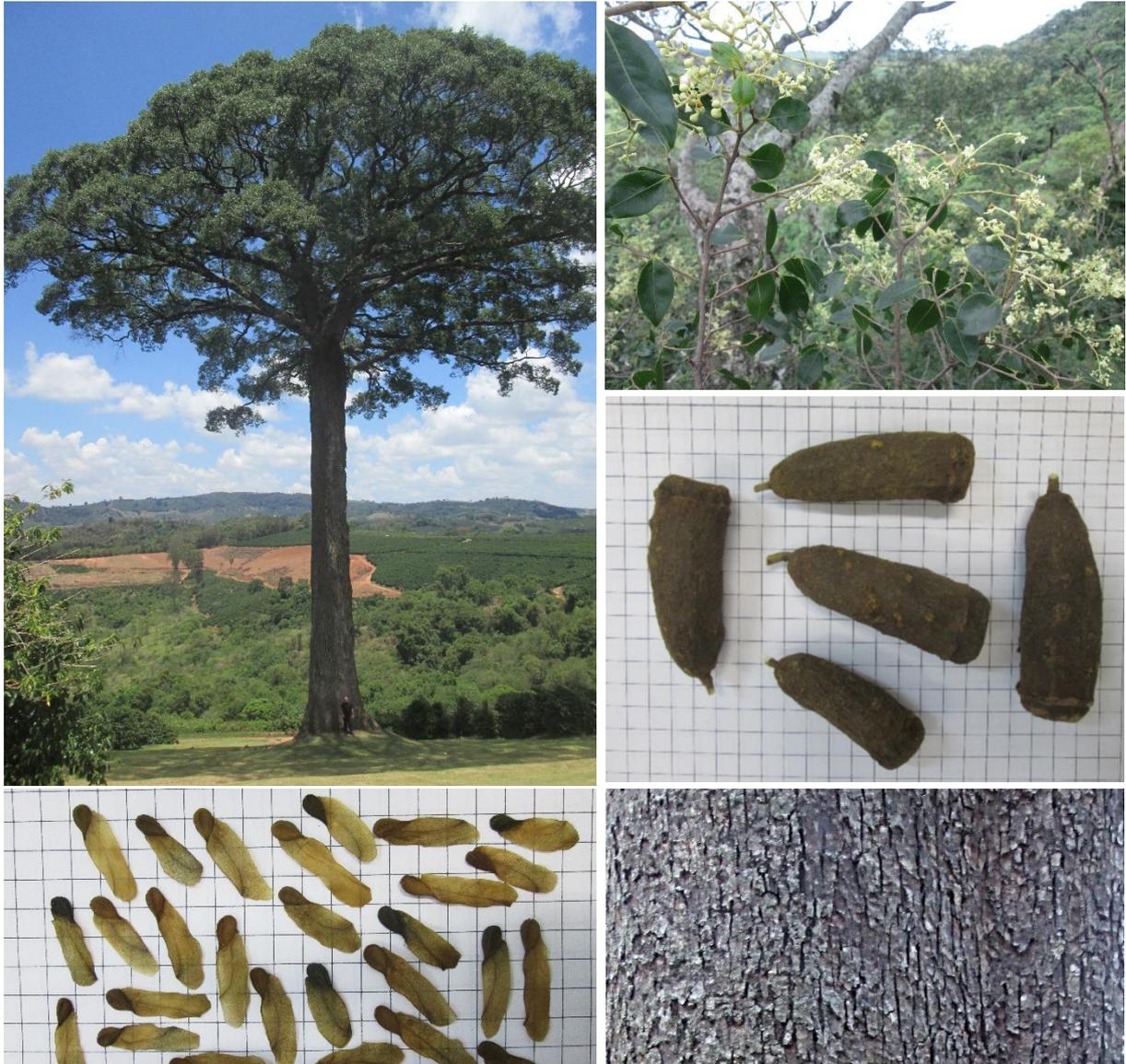


Figura 1 – *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze e seus principais órgãos: flor, folha, fruto, semente e casca.

Fonte: Pedro Santos (2015).

2.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O Jequitibá-rosa ocorre de forma natural nos seguintes estados: Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (LORENZI, 2008; RODRIGUES 2012). Nas latitudes desde 7° S a 23° S, longitudes entre 35° e 49° W e altitude de 30 m a 1000 m (CARVALHO, 2005) (Figura 2).



Figura 2 - Locais de ocorrência natural do *Cariniana legalis* no Brasil.
Fonte: Rodrigues (2012).

O jequitibá-rosa ocorre nas baixadas e encostas úmidas, no estrato superior da formação Baixo-Montanha da Floresta Ombrófila Densa-Floresta Atlântica e na formação submontana, no estado do Rio de Janeiro, na Floresta de Tabuleiro, no Norte do Espírito Santo (CARVALHO, 2006; RODRIGUES, 2012)). Na Floresta Estacional Semidecidual em formações, montanha, submontana e aluviais de Minas Gerais à bacia do Rio Paraná (LORENZI, 2008). Também é encontrado na região cacaeira do Sul da Bahia.

Apresenta distribuição irregular e descontínua ocorrendo em pequenos grupos em algumas áreas e faltando completamente em outras (RODRIGUES, 2012). Encontra-se principalmente no interior da floresta primária densa, onde ocupa o dossel superior, no entanto tolera ambientes abertos (LORENZI, 2008).

As condições climáticas ideais para o crescimento e desenvolvimento do jequitibá-rosa, são temperaturas médias entre 25 e 35°C e precipitação acima de 1.500 mm anuais (RÊGO; POSSAMAI, 2001). Em regiões com temperaturas < 15°C não ocorre a germinação nem o crescimento inicial da planta.

Ocorre em solos de origem arenítica e basáltica; espigões, encostas, solos rasos, solos úmidos e profundos, de boa fertilidade química e bem drenados (CARVALHO, 2005). Em plantações prefere solos profundos de média a boa fertilidade química, ricos em matéria orgânica, bem drenados e com textura de franca a argilosa (RÊGO, 2001).

2.3 IMPORTÂNCIA AMBIENTAL

O Jequitibá-rosa é uma árvore racemosa com copa ampla e globosa, em forma de guarda-chuva, com ramos horizontais, suporta muitas orquídeas, bromélias e cactáceas (CARVALHO, 2005).

Os jequitibás têm uma grande importância para a manutenção da diversidade e riqueza de espécies epífitas, hospedando estas formas de vida em maior abundância e exclusividade que outras espécies arbóreas (REIS; FONTOURA, 2009). Deste modo, servem de habitat para uma grande diversidade de insetos, aves, répteis e primatas que se alimentam e procriam em sua copa. Por esta razão é indispensável utilizar o jequitibá-rosa nos reflorestamentos mistos com fins ecológicos e também para o manejo da fauna e da flora (LORENZI, 2008).

Em 1992, foi observado um ninho de Harpia (*Harpia harpyja*) na bifurcação principal da copa de um *Cariniana legalis*, a 30 metros do solo (AGUIAR-SILVA et al, 2012). A árvore media 36 metros de altura e tinha 1,1 m de DAP, situada na Reserva Natural Vale, em Linhares, ES.

No sul de Minas Gerais, ainda são encontrados Jequitibás Rosa de grande porte em fragmentos de mata nativa remanescentes das atividades econômicas agrícolas e florestais, estes podem ser encontrados isolados no meio da matriz, ou no interior dos fragmentos.

2.4 IMPORTÂNCIA HISTÓRICA, SOCIAL E ECONÔMICA

O nome da espécie *legalis* deriva do latim, cujo significado é legal, devido à sua madeira ser classificada como de lei, especialmente para ser usada na construção civil e naval, só podendo ser comercializada pelo governo, na época do segundo império (REITZ, 1981). É

uma árvore tão monumental e admirada que emprestou o seu nome; Jequitibá a cidades, ruas, parques, jardins, palácios em todo o Brasil (LORENZI, 2008).

Existem indivíduos que são monumentos naturais e turísticos no Brasil, tais como: o jequitibá-rosa do Parque estadual de Vassununga em Santa Rita de Passa Quatro – SP; o jequitibá do Instituto Cabruca–BA; o jequitibá de João Neiva–ES; o jequitibá de Ipatinga–MG. No Sul de Minas Gerais, os jequitibás: da Divisa Nova; Cachoeira de Machado e Rio Sapucaí em Paraguaçu. O jequitibá-rosa do Instituto Cabruca, situado num sistema agroflorestal, na região cacauzeira de Camacan, sul da Bahia é considerado atualmente o maior do Brasil, com 41m de altura e 4,27 m de DAP (CABRUCO, 2014).

A espécie, devido à beleza e singularidade de suas características morfológicas externas, apresenta grande potencial para uso paisagístico, tanto rural quanto urbano, sendo esta uma forma de conservação da espécie (RODRIGUES, 2012).

De acordo com Oliveira (2015), é uma espécie promissora para as plantações comerciais madeireiras, visto que apresenta um bom desempenho na silvicultura, podendo ser usada nas plantações mistas ou puras, a sua madeira possui alto valor econômico. Tem aplicação semelhante à do Cedro (*Cedrela fissilis*) (CARVALHO, 2005).

A sua madeira é moderadamente densa (densidade 0,53 g/cm³; 15% de humidade), macia ao corte, grã direta, textura média, de baixa resistência ao ataque de organismos xilófagos quando exposta a condições adversas, por esta razão é indicada para estrutura de móveis, peças torneadas, contraplacados, compensados, cabos de ferramentas, salto de sapatos, confecção de brinquedos (LORENZI, 2008). Na construção civil é usada para confecção de peças internas, assim como; vigas caibros, ripas, forros, persianas, portas, entre outros (GATTI, 2011; OLIVEIRA, 2015).

Estudos sobre o uso de barris de madeiras nativas brasileiras para o envelhecimento da cachaça de cana de açúcar, comparou 9 tipos de madeiras; amendoim, ararua, cabreúva, cerejeira, grápia, ipê-roxo, jequitibá-branco, jequitibá-rosa, páu pereira, com o carvalho europeu que é a madeira mais utilizada para a confecção de barris (BORTOLETTO; ALCARDE, 2013). Obtendo os seguintes resultados; a madeira do jequitibá-rosa foi a mais semelhante ao carvalho europeu, porque forneceu mais vanilina e conteúdo de ácido vanílico para a caracterização da cachaça envelhecida. Desse modo concluíram que o jequitibá-rosa e a cerejeira podem ser usados para produzir barris destinados a ampliar e diversificar o sabor e aroma da cachaça, melhorando assim a qualidade do produto.

A casca e os frutos, usados em chás, possuem propriedades medicinais sendo utilizados em algumas regiões na medicina popular, devido ao seu poder desinfetante contra

infecções de boca e garganta, amigdalites, anginas, faringites, asma e doenças pulmonares (CARVALHO, 2006; GATTI, 2002).

2.5 SEMENTES E GERMINAÇÃO

A germinação é epígea, fanerocotiledonar ocorrendo entre 8 e 45 dias após a semeadura e a taxa de germinação é de 28 e 70% (CARVALHO, 2005; LORENZI, 2008; RÊGO, 2001).

Em seus estudos Rêgo e Possamai (2001), após terem estudado a germinação e desenvolvimento inicial do jequitibá-rosa afirmam que as sementes são recalcitrantes e à medida que aumenta o tempo de armazenamento, a partir de 30 dias após a colheita, a viabilidade delas diminui significativamente.

As temperaturas de 20-30° C, juntamente com os substratos vermiculita, solo de floresta e luz branca são os mais adequados para a germinação de sementes de jequitibá-rosa, em condições de laboratório. As mudas do jequitibá-rosa apresentam as maiores alturas sob condições de sombreamento de 50 a 66% e maior diâmetro com luminosidade a 100% (RÊGO, 2001; RÊGO; POSSAMAI, 2006).

2.6 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

Existem limitações para a produção de mudas por sementes, algumas espécies florescem intensamente, mas produzem poucas sementes, devido a diversos fatores tais como a baixa eficiência no transporte de pólen, ou em espécies zoófilas, com polinizadores pouco especializados, fazendo com que poucos estigmas recebam pólen compatível; problemas com animais pilhadores, furtadores e frugívoros (aves e macacos), que utilizam os recursos florais ou competem com os polinizadores potenciais; provocando uma perda considerável de flores (GATTI, 2002).

Outros problemas são a falta de polinizadores, o baixo número de indivíduos da espécie, a pequena quantidade de sementes viáveis, a época de coleta, o processo de coleta que em árvores altas requer técnicas de escalada (LORENZI, 2008).

A propagação vegetativa é baseada na capacidade de regeneração de um vegetal a partir de células somáticas, tem como principais vantagens a reprodução de indivíduos geneticamente iguais e a reprodução de plantas sem o uso de sementes (ALFENAS et al.,

2004). Dentre os métodos de propagação vegetativa os mais utilizados para a clonagem de árvores são: estaquia, miniestaquia, microestaquia, e micropropagação *in vitro*.

2.6.1 Micropropagação *in vitro*

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudado em diversas espécies vegetais, sendo a técnica dentro da cultura de tecidos mais difundida e que tem encontrado aplicações práticas comprovadas. As vantagens da sua utilização são a possibilidade de obter várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; a redução do tempo e da área necessária à multiplicação da espécie; as melhores condições sanitárias; a reprodução do genótipo da planta-mãe e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (LUZ et al., 2014). As fases mais críticas da micropropagação são o estabelecimento e a aclimatização, por estas razões exigem mais cuidados.

Para o enraizamento de plantas lenhosas vários fatores devem ser levados em conta, de acordo com (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998) existe um maior índice de enraizamento para os propágulos que são colhidos na primavera; estacas de secção basal e mediana; explantes provenientes de ramos laterais em ativo crescimento.

Estudos e experimentos sobre micropropagação de espécies lenhosas nativas brasileiras tem sido feitos por vários pesquisadores, obtendo resultados satisfatórios (ROCHA et al., 2007).

Em seus trabalhos Santos et al. (2006), fizeram a micropropagação do pequizeiro (*Caryocar brasiliense Camb.*) Os mesmos autores recomendam, para a micropropagação de explantes de pequizeiro a adição de $0,75\text{mg L}^{-1}$ de BAP + $0,05\text{ ANA mg L}^{-1}$ na fase de multiplicação e $3,0\text{mg L}^{-1}$ AIB + $4,0\text{ L}^{-1}$ de carvão ativado na fase de enraizamento ao meio WPM.

De acordo com Rocha et al. (2007), para a micropropagação da canjarana (*Cabrlea canjerana*), o meio de cultura MS foi mais adequado que o WPM, suplementado com $2,5\text{ }\mu\text{M}$ de BAP. O enraizamento foi de 87,5% em presença de AIB e a aclimatação foi feita em casa de vegetação e proporcionou 90% de sobrevivência das mudas depois de 30 dias. Deste modo concluíram que a micropropagação da canjarana é viável para a multiplicação da espécie.

A literatura não relata estudos sobre a micropropagação *in vitro* da espécie *Cariniana legalis*, no entanto Shekhawt e Manokari (2016) conseguiram multiplicar *in vitro* segmentos nodais com 2-3 gemas de um indivíduo com 21 anos de *Couroupita guianensis*, árvore com

propriedades medicinais da mesma família *Lecythidaceae*. Cerca de 90% dos explantes apresentaram 4.1 ± 0.23 brotos por gema, após cinco semanas de inoculação em meio MS, acrescido de 8g L^{-1} de ágar, 30g L^{-1} de sacarose, (50mg L^{-1} ácido ascórbico + 25mg L^{-1} de sulfato de adenina + 25mg L^{-1} de L-arginine + 25mg L^{-1} de ácido cítrico) e 4mg L^{-1} de BAP.

2.7 DESCRIÇÃO DA *Spilotes pullatus*

A espécie *Spilotes pullatus*, também conhecida como caninana. É um dos maiores colubrídeos encontrados na América do Sul, podendo ultrapassar 250 cm de comprimento total (MARQUES et al., 2014). É predominantemente negra na cabeça e no dorso, com faixas e manchas amarelas. O ventre é amarelado com manchas pretas, a cabeça é pouco distinta do pescoço, exceto quando se encontra inflado. Seus olhos são grandes, negros e com pupilas redondas, indicando o hábito diurno. Sua dentição é áglifa, portanto não é peçonhenta. Sob ameaça infla o pescoço e vibra a cauda e, quando capturada, é agressiva, podendo morder (PONTES; ROCHA, 2008).

Esta serpente possui hábitos diurnos, terrestres e arbóreos. Caça a sua presa em abrigos ou ninhos, tanto no chão quanto na copa das árvores. Alimenta-se de aves, ovos, roedores e morcegos, sendo as presas basicamente endotérmicas (MARTINS; OLIVEIRA, 1998).

3 METODOLOGIA

O trabalho de campo; biometria, coleta de germoplasma e registro da *Spilotes pullatus* foi realizado nas cinco árvores selecionadas. A multiplicação *in vitro*, germinação *in vitro*, aclimatização e indução de calos foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Genotoxicidade (BIOGEN) da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL – MG.

3.1 LOCAIS DE ESTUDO E COLETA DE GERMOPLASMA

Este estudo foi realizado no sul de Minas Gerais, onde foram selecionados 5 indivíduos de 42 árvores adultas nos municípios de Divisa Nova, Botelhos, Poços de Caldas, Machado, Paraguaçu, Campo do Meio, Monte Belo. Os critérios de seleção foram o maior DAP (diâmetro à altura do peito); a maior altura total; o estado fitossanitário da árvore; acessibilidade; dificuldade e segurança da escalada. A biometria e coleta de germoplasma (sementes e tecidos) foi realizada nos cinco (5) jequitibás que foram selecionados nos municípios de Divisa Nova, Botelhos, Machado e Paraguaçu.

Os jequitibás selecionados para a pesquisa foram classificados de acordo com o local de origem:

- a) 1JDN (Jequitibá-rosa da Divisa Nova);
- b) 2JGB (Jequitibá-rosa da Globo em Botelhos);
- c) 3JRSP (Jequitibá-rosa do Rio Sapucaí em Paraguaçu);
- d) 4JCM (Jequitibá-rosa da Cachoeira de Machado);
- e) 5JCMC (Jequitibá-rosa da Cachoeira de Machado no Cafezal).

O Jequitibá-rosa da Divisa Nova (1JDN) está localizado na Mata da Figueira, um fragmento florestal considerado Reserva Particular de Patrimônio Natural (2009), situado no Km 18 da rodovia LMG 880, estrada para Botelhos, município da Divisa Nova-MG (Figura 3). Conta com uma população ≥ 10 indivíduos adultos em todo o fragmento. Nas coordenadas GPS: 21° 32' 23.1'' S. 46° 12' 56.3'' W. Altitude: 897 m. As medidas para a biometria foram efetuadas em 29/10/2014 e 02/08/2015, também foram coletadas sementes, tecido vegetal e amostras de solo para análise.

O Jequitibá-rosa da Globo em Botelhos (2JGB) está localizado na Fazenda Sertãozinho, isolado no meio da plantação de café, situado no município de Botelhos-MG

(Figura 3). Propriedade da Rede Globo de Televisão. Coordenadas GPS: 21° 38' 13.5'' S. 46° 21' 48.2'' W. Altitude: 1044 m. As medidas para a biometria foram efetuadas em 29/10/2014 e também foram coletadas sementes no solo.

O Jequitibá-rosa do Rio Sapucaí em Paraguaçu (3JRSP) está localizado na Fazenda Chapéu de Sol, isolado em uma área de pastagem, situado no município de Paraguaçu-MG (Figura 3). Proprietário: Carlos Henrique Martins Ribeiro. Coordenadas GPS: 21° 33' 42'' S. 45° 40' 30'' W. Altitude: 830 m. As medidas para a biometria foram efetuadas em 29/10/2014 e 04/10/2015, também foram coletadas sementes, tecido vegetal e amostras de solo para análise.

O Jequitibá-rosa da Cachoeira de Machado (4JCM) está localizado em um fragmento florestal próximo a um curso de água, situado no bairro rural do Rosental, município de Machado-MG (Figura 3). Proprietário: Jaci Miguel. Conta com uma população ≥ 15 indivíduos adultos em todo o fragmento, separados pela cachoeira de um lado e pela estrada do outro, com altura ≥ 20 m. Coordenadas GPS: 21° 35' 12.7'' S. 45° 59' 37.2'' W. Altitude: 870 m. As medidas para a biometria foram efetuadas em 30/10/2014, 16/03/2015, 26/07/2015 e também foram coletadas sementes, tecido vegetal e amostras de solo para análise.

O Jequitibá-rosa da Cachoeira de Machado no Cafezal (5JCMC) está localizado em uma plantação de café, distante 100 m do fragmento florestal onde se encontra o anterior, situado no bairro rural do Rosental, município de Machado-MG (Figura 3). Proprietário: Jaci Miguel. Coordenadas GPS: 21° 35' 18.3'' S. 45° 59' 38.2'' W. Altitude: 881 m. As medidas para a biometria foram efetuadas em 30/10/2014, 25/02/2015 e também foram coletadas sementes, tecido vegetal e amostras de solo para análise.

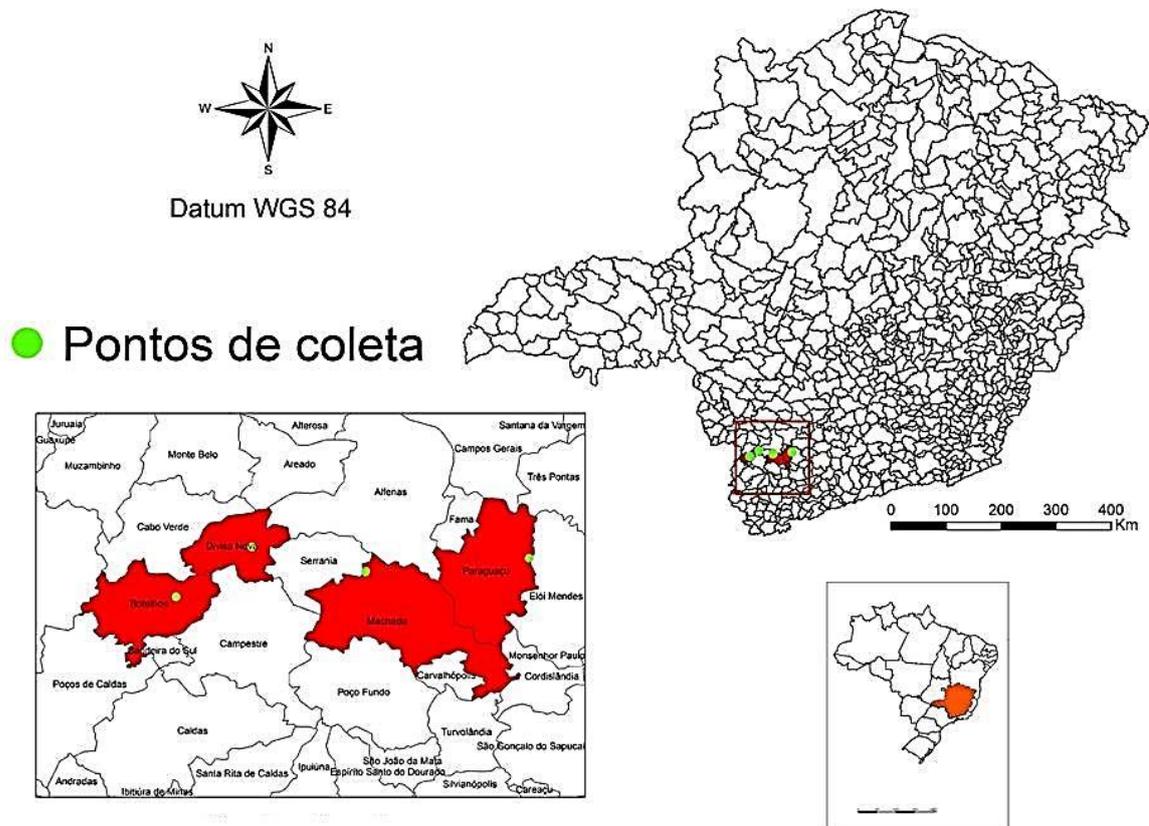


Figura 3 - Localização geográfica dos cinco *Cariniana legalis* do estudo.
Fonte: Pedro Santos (2014).

3.2 BIOMETRIA E ESTIMATIVA DE IDADE.

As árvores foram mapeadas por GPS, fotografadas e cadastradas. Após autorização perante os proprietários ou os órgãos responsáveis (ANEXO B) foi feita a biometria de cada indivíduo mensurando o CAP (circunferência à altura do peito 130cm), calculado o DAP (diâmetro à altura do peito), altura total, altura do fuste, altura e diâmetro da copa. Para mensurar CAP foi utilizado o método da fita métrica, segundo o qual o diâmetro é medido a 130 cm de altura do chão, pelo lado superior da árvore em locais com declividade (ENCINAS; SILVA; TICHETTI, 2002). O DAP foi calculado por meio da seguinte fórmula: $DAP = CAP / \pi$.

Para mensurar as variáveis: altura total, altura do fuste principal e altura da copa foram usados dois métodos:

1. Prancheta Dendrométrica: por semelhança de triângulos calculou-se a altura da árvore (ENCINAS; SILVA; TICHETTI, 2002).

2. Escalada: um escalador realizou pontualmente as tomadas de dados da árvore e mensurou a altura total, altura do fuste principal e altura da copa com uma fita métrica de 50 m.

Para mensurar o diâmetro da copa, foi marcado no solo os limites da copa e medido com fita métrica.

Os equipamentos utilizados para fazer a biometria foram a Fita métrica de 50 m da marca IRWIN profissional, Fita métrica de 5 m, giz, prancheta dendrométrica, fichas de biometria.

A idade das árvores foi estimada baseada em comparação com taxas de incremento de Circunferência à altura do peito (IC) de 14,4 mm anuais (MARIA, 2002). De acordo com este método a idade foi estimada pela seguinte fórmula: $CAP \text{ (cm)} / IC \text{ (cm)} = \text{idade}$.

3.3 ESCALADA E COLETA DE GERMOPLASMA

A escalada dos Jequitibás foi feita por um escalador especializado em dendrobiometria, com equipe de apoio constando de duas pessoas treinadas segundo Medeiros e Nogueira (2006). O método consistiu em utilizar um arco de 50 libras de potência para atirar uma flecha com peso de 100 gramas na ponta, na qual foi amarrado um fio de nylon 0,90 mm (Figura 4A), após o fio transpassar o galho, foi amarrada uma corda de 4 mm que por sua vez se conecta na corda principal de 11mm. Após testar a resistência do galho para suportar a subida, foi utilizada a técnica de ascensão em corda fixa (Figura 4B), que é usada nos deslocamentos até à copa da árvore (TREE CLIMBERS, 2015). Este método possibilita maior mobilidade, não danifica as árvores e permite alcançar os galhos periféricos onde se encontram as sementes (MEDEIROS; CHODOR; BULGACOV, 2007).



Figura 4 - Imagens ilustrativas da técnica de escalada utilizada no estudo: Instalando a corda fixa (A); Ascensão em corda fixa (B).

Fonte: Pedro Santos (2015).

Os equipamentos utilizados para instalar a corda fixa foram: arco recurvo da marca Touchwood com 50 libras de potência, 2 flechas de fibra de carbono da marca Easton spin 500, 2 pesos de 100 gramas, 100 m de fio de nylon 0,90 mm, 120 m de corda 4 mm.

Os equipamentos utilizados para a escalada foram: 100 m de corda estática de 11 mm da marca Cousin com 3000 kgf de resistência, 50 m de corda dinâmica de 11 mm da marca Roca, ascensores, descensores, arnês de escada, capacete, mosquetões, costuras, fitas, cordeletes da marca Petzl (PETZL, 2015; TREE CLIMBERS, 2015). Todos os equipamentos utilizados na escalada são homologados pela União Internacional de Associações de Alpinismo (UIAA, 2015).

Foram usadas duas câmeras fotográficas, uma da marca Canon profissional, modelo T3i, lentes 18-55 mm, outra da marca Canon, modelo PowerShot A2500, lentes 5-25 mm e um binóculo da marca Bushnell, modelo 13-7016, com 7-15x35 mm.

Foram coletados frutos e tecido vegetal (Figura 5) nos pontos previamente observados com o auxílio de binóculos.



Figura 5 - Imagens ilustrativas da coleta de germoplasma: Coleta de frutos (A); Coleta de ramos jovens (B).

Fonte: Pedro Santos (2015).

Depois de efetuar a coleta o pesquisador desce de rappel (PETZL, 2015).

Os equipamentos utilizados na coleta foram a tesoura, tesourão com extensão de 10 m, sacos para coleta, caixas térmicas e fichas de coleta.

O germoplasma (ramos jovens) após desinfestação com etanol 50% (v/v) foi armazenado em caixas térmicas com solução de hipoclorito de sódio 0,01% (v/v), os frutos com sementes foram desinfestados com etanol 50% (v/v), os quais foram levados para o Laboratório de Biotecnologia e Genotoxicidade (BIOGEN) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – MG.

3.4 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biotecnologia e Genotoxicidade da UNIFAL entre os períodos de 27/02/2015 e 10/10/2015.

Ramos jovens surgidos de brotações recentes foram coletados na copa das árvores matrizes, em seguida foram lavados em água corrente por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, segmentos nodais, com uma gema e aproximadamente 1,5 cm foram submetidos à desinfestação com solução de etanol 70% (v/v) por 2 min, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), acrescido de Tween[®]20 (4% v/v) por 30 min, em agitação. Em seguida, foram lavados quatro vezes em água destilada esterilizada, de acordo com metodologia descrita por Rocha et al.(2007).

Os segmentos nodais, contendo uma gema e de aproximadamente 1,5 cm foram inoculados em meio MS, acrescido de 800mg L⁻¹ de PVP (polivinipirrolidona), 30g L⁻¹ de sacarose, 7g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de ANA (0,54 e 1,08 µM) e BAP (2,22; 4,44; 8,88; 17,76; 35,52 e 71,04 µM) e a ausência destes reguladores como controle, sendo o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8 e posteriormente, autoclavado a 121° C e 1,0 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura 25±1°C e intensidade luminosa de 36µmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3 x 7 (concentrações de ANA x concentrações de BAP) e a ausência destes, totalizando 21 tratamentos, com 10 repetições. Em cada repetição foi utilizada um explante, num total de 210 explantes.

De acordo com Santos et al. (2006), após 40, 60 e 90 dias foram avaliados o número de brotações, o número de folhas, o número de gemas por explante, a taxa de multiplicação e a altura da maior brotação.

Os dados de percentagem obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$), utilizou-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2014).

3.5 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

Os experimentos foram realizados entre outubro de 2014 e dezembro de 2015. Foram utilizadas sementes de frutos maduros coletados no solo próximo às árvores matrizes e sementes de frutos em fase de amadurecimento na copa dos jequitibás-rosa (LORENZI, 2008). No Laboratório todas as sementes passaram por um processo de secagem e desinfestação.

3.5.1 Germinação *in vitro* de sementes coletadas no solo

Foram utilizadas sementes de frutos maduros coletados na última semana de outubro de 2014, no solo próximo às árvores matrizes de *Cariniana legalis*.

Os frutos ficaram ao sol durante 10 dias para a sua abertura espontânea e liberação de sementes, depois foi retirada a ala de cada semente.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à desinfestação com solução de etanol 70% (v/v) por 1 min, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), por 15 min, em agitação. Em seguida, foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada.

Posteriormente foram inoculadas em frascos (25 x 150 mm) contendo 20 ml de diferentes meios de cultura; MS/2 (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com metade da concentração de sais minerais e vitaminas e WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8 e posteriormente, autoclavado a 121° C e 1,0 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura 25±1°C e intensidade luminosa de 36µmol m⁻² s⁻¹. Para avaliar a descontaminação foi acrescido ao meio de cultura o fungicida e bactericida Kasumin® nas concentrações (0 e 1 ml L⁻¹).

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema factorial 2 x 2 (tipos de meio de cultura x concentrações de Kasumin®) totalizando 4 tratamentos, com 35 repetições cada um. Em cada repetição foi utilizada uma semente, num total de 140 sementes, sendo as sementes de cada indivíduo identificadas.

As avaliações da germinação e contaminação ocorreram aos 15, 30 e 60 dias.

Os dados da percentagem de germinação obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$), utilizou-se o programa estatístico SISVAR.

3.5.2 Padronização de retirada de sementes e desinfestação, para frutos coletados na copa das árvores

Foram utilizadas sementes de frutos maduros coletados na copa das árvores matrizes entre a última semana de julho e a primeira semana de outubro de 2015. Os frutos ficaram ao sol durante 10 dias para a sua abertura espontânea e liberação de sementes (Figura 6), depois foi retirada a ala. Na figura 6 também pode ser observada a quantidade média de sementes por fruto de 1JDN.



Figura 6 - Imagens ilustrativa de frutos e sementes de jequitibá-rosa da Divisa Nova, após ficarem 10 dias ao Sol.

Fonte: Pedro Santos (2015).

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à desinfestação com solução de etanol 70% (v/v) por 1min, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), acrescido de Tween[®]20 (4% v/v) por 30 min, em agitação. Em seguida, foram lavadas quatro vezes em água destilada esterilizada.

3.5.3 Germinação *in vitro* de sementes coletadas na copa dos Jequitibás-rosa.

Para avaliar a quebra de dormência, em câmara de fluxo laminar, as sementes de jequitibá-rosa (com 10 dias) que já haviam sido desinfestadas foram submersas diferentes tempos em 100 ml de água destilada esterilizada (0h; 24h; 48h e 48h solução com 867 μ M GA₃) (FLOWER; BIANCHETTI, 2000).

Após o tempo de imersão em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas novamente em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos, seguida de

imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por 20 min, em agitação. Em seguida, foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada e secas em papel filtro autoclavado.

Posteriormente foram inoculadas em frascos (25 x 150 mm) contendo 20 ml de meio de cultura MS (MURASHIDE; SKOOG, 1962), acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 800 g L⁻¹ de PVP e diferentes concentrações de GA₃ (ácido giberélico) (0,00; 14,45; 28,90; 43,35 e 57,80 µM) sendo o pH do meio de cultivo ajustado para 5,8 e posteriormente, autoclavado a 121° C e 1,0 atm, por 20 minutos (Tabela 1).

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura 25±1°C e intensidade luminosa de 36µmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema factorial 4 x 5 (imersão em água destilada x concentrações de GA₃) totalizando 20 tratamentos, com 10 repetições cada um (Tabela 1). Em cada repetição foi utilizada uma semente, num total de 200 sementes.

A germinação foi avaliada após a primeira semente germinar até aos 60 dias.

Os dados de percentagem obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knot (p<0,05), utilizou-se o programa estatístico SISVAR.

Tabela 1 - Tempos de Imersão em água destilada x Concentração GA₃, para a germinação de sementes de *Cariniana legalis*, do tratamento 16 ao 20 foram imersas 48h em solução de água destilada acrescida de 867 µM GA₃.

Tratamentos	(continua)	
	Imersão em água destilada (horas)	Concentração de Ga ₃ (µM)
T1	0	0,00
T2	0	14,45
T3	0	28,90
T4	0	43,35
T5	0	57,80
T6	24	0,00
T7	24	14,45
T8	24	28,90
T9	24	43,35
T10	24	57,80
T11	48	0,00

Tabela 1 - Tempos de Imersão em água destilada x Concentração GA₃, para a germinação de sementes de *Cariniana legalis*, do tratamento 16 ao 20 foram imersas 48h em solução de água destilada acrescida de 867 μM GA₃.

Tratamentos	Imersão em água destilada (horas)	(conclusão)
		Concentração de Ga ₃ (μM)
T12	48	14,45
T13	48	28,90
T14	48	43,35
T15	48	57,80
T16	48 + 867 μM GA ₃	0,00
T17	48 + 867 μM GA ₃	14,45
T18	48 + 867 μM GA ₃	28,90
T19	48 + 867 μM GA ₃	43,35
T20	48 + 867 μM GA ₃	57,80

Fonte: Pedro Santos (2015).

3.6 ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DAS PLANTAS

Foram utilizadas mudas germinadas e cultivadas *in vitro* com 70 a 100 dias após a germinação, já enraizadas com 5 a 7,6 cm de altura, 4 a 7 folhas, 0,14 a 0,20 cm de diâmetro a 1,3 cm do solo e raízes com aproximadamente 10 cm de comprimento.

A aclimatização constou de duas etapas sucessivas. Na 1ª etapa os frascos (61 x 155 mm) foram abertos em câmara de fluxo laminar e após 15 minutos foram tampados com papel filtro e mantidos em sala de aclimatização com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25±1°C, irradiância de fótons de 60 μmol m⁻²s⁻¹, durante 10 dias.

Para a 2ª etapa, as plantas foram retiradas dos frascos e lavadas para remover os resíduos de meio de cultura aderidos às raízes, sendo posteriormente feito o plantio em vasos (550 cm³) contendo os diferentes substratos, os quais foram previamente autoclavados a uma temperatura de 120°C e 1,0 atm, por 30 minutos.

Em seguida cada uma das plantas foi coberta com garrafa tipo *pet* com tampa, para manter a alta umidade relativa do ar de acordo com Müller et al. (2013) e mantida em sala de aclimatização. Durante este período as plantas foram irrigadas com solução de sais do meio MS/2 (20 ml por planta) de 7 em 7 dias (LUZ et al., 2014). A tampa da garrafa *pet* foi aberta

gradativamente, até à total remoção aos 15 dias após o plantio. A cobertura plástica foi retirada aos 30 dias, de acordo com metodologia descrita por Santos et al., (2006).

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), constando de dois tratamentos sendo eles: substrato vermiculita média; substrato solo de floresta do local de desenvolvimento do 1JDN (análise em ANEXO C). Foram utilizadas 10 repetições, sendo cada repetição formada por uma planta.

Após o término da segunda etapa (30 dias) foram avaliadas as características; aumento da parte aérea, aumento do nº de folhas, aumento do diâmetro a 1,3 cm do solo e percentagem de plantas vivas em função dos tratamentos aos quais as plantas foram submetidas nesta fase.

O crescimento e desenvolvimento das plantas foi avaliado aos 90 e 120 dias após o início da aclimatização, tendo sido avaliadas as mesmas variáveis.

Para mensurar altura foi usada uma régua de 25 cm e para mensurar diâmetro foi usado um paquímetro da marca Kingtools 150 x 0.05mm/6”.

Os dados numéricos e de percentagem obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$), utilizou-se o programa estatístico SISVAR.

3.7 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA

O germoplasma dos jequitibás-rosa será conservado sob a forma de plantas e calos no Laboratório de Biotecnologia e Genotoxicidade (BIOGEN) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – MG.

3.7.1 Indução de calos

Em câmara de fluxo laminar, segmentos caulinares de aproximadamente 0,5 cm de comprimento e segmentos foliares cotiledonares de aproximadamente 0,25 cm², provenientes de plântulas germinadas *in vitro* foram utilizadas como explantes.

Para a indução de calogênese os segmentos caulinares foram inoculados na posição horizontal e os cotiledonares na posição abaxial, em frascos (25 x 150 mm) contendo 20 ml de meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose e diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) (0,00; 0,54 µM) e 6-

benzilaminopurina (BAP) (0,00; 6,66; 13,32 μM), sendo o pH do meio de cultivo ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,0 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), constando da interação ANA x BAP, num total de doze tratamentos, para os dois tipos de segmentos (Tabela 2). Foram utilizadas 10 repetições, sendo cada repetição formada por um explante.

Os dados de percentagem obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$), utilizou-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2014).

Após 40, 70 dias de cultivo foram avaliados: o percentual de explantes com calos, o peso e aumento da massa fresca (70 dias) em função dos tratamentos aos quais foram submetidos.

Tabela 2 – Concentração de reguladores de crescimento, para a indução de calos em explantes caulinares e cotiledonares de jequitibá-rosa.

Tratamento	Explante	Concentração de ANA (μM)	Concentração de BAP (μM)
T1	Caulinar	0,00	0,00
T2	Caulinar	0,00	6,66
T3	Caulinar	0,00	13,32
T4	Caulinar	0,54	0,00
T5	Caulinar	0,54	6,66
T6	Caulinar	0,54	13,32
T7	Cotiledonar	0,00	0,00
T8	Cotiledonar	0,00	6,66
T9	Cotiledonar	0,00	13,32
T10	Cotiledonar	0,54	0,0
T11	Cotiledonar	0,54	6,66
T12	Cotiledonar	0,54	13,32

Fonte: Pedro Santos (2015).

3.8 REGISTRO DA *Spilotes pullatus*

Durante a execução da escalada para a obtenção do germoplasma foi registrado de forma inédita à altura de 31 m, o comportamento de duas cobras caninanas. Sendo realizado o registro e mensuração das mesmas.

O registro foi realizado no indivíduo de jequitibá-rosa localizado no fragmento florestal (21°35'12.7" S, 45°59'37.2" W, altitude de 870 m) próximo a uma cachoeira, situado na zona rural do Rosental, município de Machado – MG (IJCM) (ANEXO A, Figura 1). A biometria das serpentes avistadas no jequitibá-rosa foi realizada com a auxílio do software Image J versão 1.48, por meio do qual as caninanas registradas nas fotografias foram mensuradas por comparação com uma medida já conhecida da árvore como padrão (RASBAND, 2012). A medida padrão utilizada foi o diâmetro do fuste secundário de 140 cm, o qual foi obtido a 30 cm abaixo do oco entre o 2° e o 4° galhos (ANEXO A, Figura 3). Com base nestes valores, foram correlacionados os diâmetros do fuste secundário com o comprimento total e a largura no meio do corpo das serpentes. Foram realizadas cinco mensurações de comprimento total e de altura no meio do corpo para cada serpente e, em seguida, calculadas as médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com este estudo foi realizada a biometria e estimada a idade dos cinco jequitibás da pesquisa. Também foi efetuada a multiplicação *in vitro*, germinação *in vitro*, aclimatização e conservação de germoplasma dos *Cariniana legalis*. Durante a pesquisa de campo foram registradas e mensuradas duas serpentes caninanas (*Spilotes pullatus*), na copa de um dos jequitibás-rosa.

4.1. BIOMETRIA E IDADE

Os jequitibás-rosa desta pesquisa se encontram em terrenos com declive superior a 15%, altitude entre 830 m e 1044 m. Latitude 21° S e Longitude entre 45° e 46° W.

Os jequitibás-rosa desta pesquisa tem de biometria: DAP entre 1,51 m e 2,80 m; altura total entre 35,70 m e 50,00 m; idades entre 330 e 611 anos (Tabela 3). São alguns dos maiores (DAP e altura total) e mais velhos encontrados no Sul de Minas Gerais. Foi realizada a exsicata n° 2689 do jequitibá-rosa (1JDN), no Herbário da Universidade de Alfenas (UALF).

Foram coletadas nas copas dos jequitibás-rosa exemplares de epífitas que estão em processo de identificação no Laboratório de Ecologia de Fragmentos Florestais da UNIFAL. Também se observaram colmeias de abelhas nativas em todos os indivíduos, em alguns foram encontradas colmeias de abelhas africanas e macacos-prego.

Durante a realização da pesquisa de campo não foram encontradas plantas jovens de até 2 metros de altura de Jequitibá-rosa, num raio de 50 metros das árvores em estudo, isso demonstra que as árvores devido à sua alta idade, não estão produzindo sementes viáveis, ou estas se apresentam com dormência (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Em 2016, apenas um dos *Cariniana legalis* (2JGB) desta pesquisa frutificou (Tabela 3), o que pode contribuir para a extinção da espécie e de outras espécies vegetais e animais que usam a sua copa como nicho ecológico. De acordo com Tambarussi et al. (2015) e Guidugli et al. (2010) o isolamento espacial entre as populações de *C. legalis* provocado pela fragmentação florestal afeta negativamente a reprodução e o fluxo gênico, o que resulta na redução do número de indivíduos capazes de se reproduzirem.

Tabela 3 - Biometria, idade estimada e frutificação dos *Cariniana legalis* onde foram coletadas as sementes e os explantes.

Parâmetros	Indivíduo				
	5JCMC	4JCM	1JDN	3JRSP	2JGB
CAP (m)	4,75	6,60	8,80	6,28	7,26
DAP (m)	1,51	2,10	2,80	2,00	2,31
Altura total (m)	35,70	36,80	40,06	50,00	38,80
Altura do fuste (m)	21,00	22,50	23,30	33,80	23,00
Altura da copa (m)	14,70	14,30	16,76	16,20	15,80
Diâmetro da copa (m)	25,50	27,20	28,60	24,30	27,50
Idade estimada (anos)	330	458	611	436	504
Frutificação	2014 sim	2014 sim	2014 sim	2014 não	2014 sim
	2015 sim	2015 sim	2015 sim	2015 sim	2015 não
	2016 não	2016 não	2016 não	2016 não	2016 sim

Fonte: Pedro Santos (2015).

Ao longo dos anos a literatura está demonstrando que os Jequitibás-rosa, principalmente os grandes estão desaparecendo, as árvores têm de 7 a 60 m de altura e 15 a 400 cm de DAP, na idade adulta e frequência de 2 árvores/hectare (RIZZINI, 1971; MORI; PRANCE, 1983; PEIXOTO et al., 1995). De acordo com Carvalho (2003) e Lorenzi, (2008), o Jequitibá-rosa tem comumente 30 a 50 m de altura e 70 a 100 cm de DAP. Estudo recente de composição e estrutura da comunidade arbórea de um fragmento florestal de 10 hectares em Socorro, SP, (divisa com Sul de Minas) mostra que os jequitibás-rosa encontrados têm uma altura média de 9,83 m, DAP médio de 9,6 cm e densidade de 0.9 árvore/hectare (SARTORI et al., 2015). A ocorrência é cada vez menor onde eram endêmicos, entre as causas estão a exploração madeireira, o avanço da fronteira agrícola e a fragmentação do habitat.

4.2 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

Nos experimentos realizados não ocorreram brotações em segmentos nodais de *Cariniana legalis*, aos 40, 60 e 90 dias de cultivo nas diferentes épocas do ano em que foram realizados os experimentos. A contaminação foi de 50% e o restante dos explantes se encontravam senescentes aos 90 dias, o que inviabilizou a resposta.

Como a utilização de explantes provenientes de partes juvenis dos Jequitibás não apresentou resultados positivos, foi feito o rejuvenescimento das partes aéreas por meio de podas sucessivas, mas também não ocorreram brotações.

Em experimentos realizados com segmentos nodais de plantas estabelecidas *in vitro* para a micropropagação da espécie, também não ocorreram brotações, mas ocorreu calogênese em meio MS, acrescido de diferentes concentrações de ANA + BAP.

Existem fatores ligados à planta-matriz que influenciam a multiplicação *in vitro* dos seus explantes, tais como: genótipo; estresse hídrico; carboidratos; nutrição mineral; condições de crescimento da planta e Idade Fisiológica (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

A multiplicação *in vitro* de explantes provenientes de plantas lenhosas adultas tem constituído um desafio a ser vencido. Um dos métodos é a utilização de explantes provenientes de partes juvenis das plantas adultas. Outro método é a promoção do rejuvenescimento de partes aéreas da planta adulta por meio de podas (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). Visto que o jequitibá-rosa brota de touça após corte, tendo capacidade de regeneração (CARVALHO, 2005).

Recomenda-se em estudos futuros para a multiplicação *in vitro* da *Cariniana legalis*, utilizar outros tipos de auxinas e citocininas que ainda não foram testados, assim como: Indole-3-acetic acid (AIA), Kinetin (KIN), 6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2iP), Thidiazuron (TDZ).

4.3 GERMINAÇÃO

A germinação das sementes coletadas no solo e das coletadas na copa das árvores matrizes foi avaliada diariamente até aos 60 dias após a inoculação destas.

4.3.1 Germinação *in vitro* de sementes coletadas no solo

As sementes dos *Cariniana legalis* coletadas nos frutos caídos no solo no final de outubro de 2014, aproximadamente de 1 a 2 meses após a sua queda não germinaram.

De acordo com (CARVALHO, 2005; LORENZI, 2008) para obtenção de sementes de jequitibá-rosa os frutos devem ser colhidos na copa da árvore, quando mudam de coloração verde para marrom e se inicia a abertura dos opérculos. A partir do 30º dia após a colheita, a viabilidade das sementes diminui significativamente (RÊGO; POSSAMAI, 2001).

4.3.2 Germinação *in vitro* de sementes coletadas na copa dos Jequitibás-rosa

A Germinação *in vitro* de sementes dos jequitibás-rosa se iniciou aos 10 dias após inoculação e se estendeu até aos 60 dias (Figura 7). As maiores percentagens de germinação foram obtidas com sementes que ficaram imersas em água diferentes tempos (48h; 24h e 48 h em solução de 867 μM GA₃), obtendo-se respectivamente 34; 22 e 20% de germinação. Quando não ficaram imersas em água apenas 18 % das sementes germinaram. Em relação às concentrações de GA₃, as maiores percentagens de germinação ocorreram nas concentrações (14,45; 28,90; 43,45 e 57,80 μM), obtendo-se (37,50; 22,5; 22,5 e 20%) de sementes germinadas respectivamente. Quando não houve acréscimo de GA₃ no meio de cultura apenas 15% das sementes germinaram (Tabela 4).

Os tratamentos que originaram as maiores percentagens de germinação foram: 48h imersão em água + 14,45 μM GA₃, com 70% das sementes germinadas; 48h imersão em água + 43,45 μM GA₃ e 24h imersão em água + 43,45 μM GA₃, obtendo-se 40% de sementes germinadas em cada tratamento (Tabela 5). Segundo Santos et al. (2003), as giberelinas estão diretamente relacionadas à germinação de sementes, participando na superação da dormência e no controle da hidrólise de reservas nutricionais.

O menor percentual de germinação 10% ocorreu no controle e nos tratamentos; sem imersão em água combinado com 43,45 e 57,80 μM GA₃; 24h + 0,00 μM GA₃ e 24h + 28,90 μM GA₃. O que confirma a dormência das sementes de *Cariniana legalis* (RÊGO; POSSAMAI, 2001).

As sementes que germinaram 40 dias após a inoculação entraram em calogênese depois da emissão da radícula (Figura 7F). As maiores taxas de calogênese 16% ocorreram em sementes que ficaram imersas 48h em água e sem imersão. Em relação às concentrações de

GA₃ os melhores resultados ocorreram com 28,90 μM GA₃ (17,5%) e 43,45 μM GA₃ (15%) (Tabela 4).

O tratamento que induziu a maior taxa de calogênese (40%) nas sementes foi imersão em água 48h + 43,45 μM GA₃ (Tabela 5). A calogênese de sementes de *Cariniana legalis* não foi o objetivo deste experimento, ocorreu ocasionalmente, um dos motivos pode ser o tempo de Germinação. Segundo Rêgo (2001), as sementes de jequitibá-rosa quando germinam tardiamente apresentam uma quebra de hipocótilo, não completando o geotropismo negativo. Este fato associado; a cultivo *in vitro*; quantidade de sais minerais e vitaminas do meio MS; suplementação com 30 g L⁻¹ sacarose; idade e o estado fitossanitário da planta-matriz doadora de sementes podem explicar a calogênese destas.

Tabela 4 - Efeitos da imersão em água (horas) e concentrações de GA₃ (μM) na taxa média de germinação e calogênese de sementes de *Cariniana legalis*.

	Germinação (%)	Calos após germinação (%)
Imersão em água		
0	18,0 d	16 a
24	22,0 b	8 e
48	34,0 a	16 a
48 + 867 μM GA ₃	20,0 c	12 c
Concentrações de GA ₃		
0,00	15,0 d	10 d
14,45	37,5 a	10 d
28,90	22,5 b	17,5 a
43,45	22,5 b	15 b
57,80	20,0 c	12,5 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são estatisticamente significativas entre si, de acordo com o teste Scott-Knot ($p < 0.05$).

Fonte: Pedro Santos (2015).

Tabela 5 - Influência da imersão em água (horas) combinada com concentrações de GA₃ (μM) na taxa média de germinação e calogênese de sementes de *Cariniana legalis*.

Tratamentos	Germinação (%)	Calos após germinação (%)
0 h + 0,00 GA ₃	10 e	10 c
0 h + 14,45 GA ₃	30 c	30 a
0 h + 28,90 GA ₃	30 c	30 a
0 h + 43,35 GA ₃	10 e	10 c
0 h + 57,80 GA ₃	10 e	0 d
24 h + 0,00 GA ₃	10 e	0 d
24 h + 14,45 GA ₃	20 d	0 d
24 h + 28,90 GA ₃	10 e	0 d
24 h + 43,35 GA ₃	30 c	10 c
24 h + 57,80 GA ₃	40 b	30 a
48 h + 0,00 GA ₃	20 d	20 b
48 h + 14,45 GA ₃	70 a	0 d
48 h + 28,80 GA ₃	20 d	20 b
48 h + 43,35 GA ₃	40 b	40 a
48 h + 57,80 GA ₃	20 d	10 c
48 h/GA ₃ + 0,00 GA ₃	20 d	10 c
48 h/GA ₃ + 14,45 GA ₃	30 c	10 c
48 h/GA ₃ + 28,90 GA ₃	30 c	20 b
48 h/GA ₃ + 43,35 GA ₃	10 e	10 c
48 h/GA ₃ + 57,80 GA ₃	10 e	10 c
Significância da ANOVA		
Imersão em água (A)	***	***
Concentrações de GA ₃ (B)	***	*
A x B	***	***

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são estatisticamente significativas entre si, de acordo com o teste Scott-Knot ($p < 0.05$). Interação entre imersão em água x concentrações GA₃ foi feita usando ANOVA. *Significante $p < 0.05$; ***significante $p < 0.001$.

Fonte: Pedro Santos (2015).

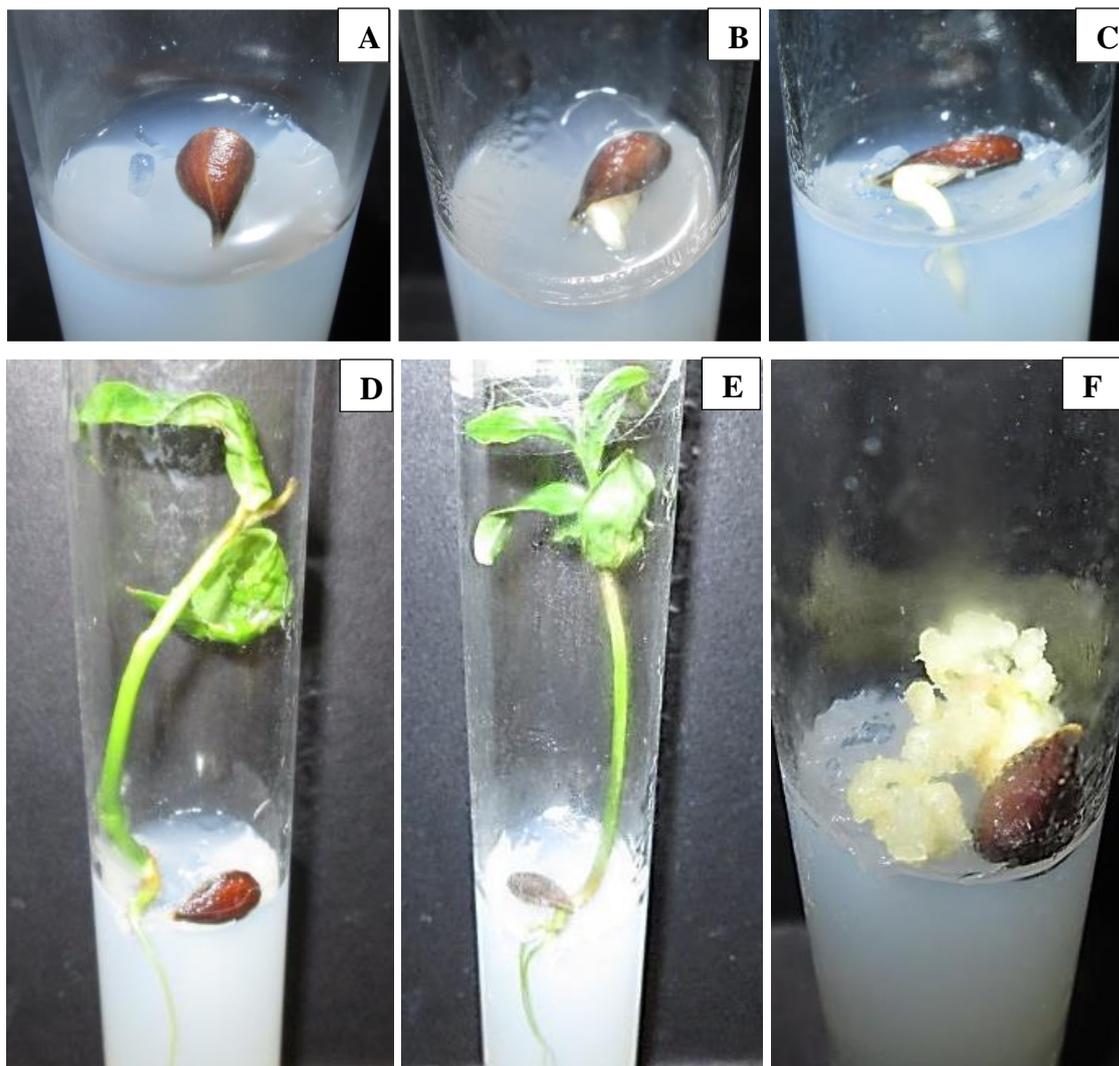


Figura 7 - Imagens ilustrativas da germinação de sementes de jequitibá-rosa da Divisa Nova: Semente (A); Início da germinação (B); Desenvolvimento inicial da germinação (C); Plântula (D); Planta (E); Calogênese (F).

Fonte: Pedro Santos (2015).

4.4 ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DAS PLANTAS

No início da aclimatização no substrato vermiculita e solo floresta, as plantas apresentaram médias estatisticamente iguais entre si para todos os parâmetros avaliados (Tabela 6).

O maior percentual de sobrevivência foi obtido nas plantas aclimatizadas em substrato solo de floresta, obtendo-se 100% de sobrevivência. Quando as plantas foram aclimatizadas em substrato vermiculita a taxa de sobrevivência foi de 80%.

O substrato solo de floresta (Figura 8C e 8D) proporcionou a maior percentagem de aumento da parte aérea das plantas 15,39% e a maior percentagem de aumento do diâmetro

18,02% (Tabela 7). Quando as plantas foram aclimatizadas em substrato vermiculita (Figura 8A e 8B) a percentagem de aumento da parte aérea foi de 9,84% e a percentagem de aumento do diâmetro foi de 13,34%. Em relação ao nº de folhas o substrato vermiculita proporcionou a maior média de aumento 65,47%.

Aos 90 dias após o início da aclimatização o substrato solo de floresta apresentou os melhores resultados em relação ao substrato vermiculita em todos os parâmetros avaliados, com exceção da sobrevivência que foi estatisticamente igual (80%). Em seus estudos sobre o crescimento inicial do jequitibá-rosa, Rêgo e Possamai (2004), utilizaram substrato solo de floresta retirado dos primeiros 25 cm do solo de um fragmento florestal para o transplante de mudas germinadas em vermiculita.

Após 120 dias do início da aclimatização as plantas cultivadas em solo floresta apresentaram um crescimento de 103,08% em altura, 282,36% no número de folhas e 93,76% no diâmetro, sendo superior ao obtido na vermiculita ($p < 0.05$) (Tabela 7). A taxa de sobrevivência (80%) foi igual para os dois tipos de substratos. As plantas cultivadas em solo floresta continuaram a crescer com vigor, enquanto que na vermiculita o seu desenvolvimento foi lento, mesmo com a suplementação de meio MS/2 a cada 7 dias. Isto se deve ao teor de nutrientes presentes no substrato, enquanto a vermiculita é inerte, o substrato solo de floresta apresenta altas concentrações de matéria orgânica, macro e micronutrientes e ausência de metais pesados (ANEXO C). Segundo Carvalho (2005), a *Cariniana legalis* prefere solos húmidos e profundos, ricos em matéria orgânica, de boa fertilidade química e bem drenados.

Resultados similares foram observados por Rêgo e Possamai (2006) no quais, os substratos vermiculita e solo de floresta foram os mais adequados para a germinação e desenvolvimento inicial das plantas de *Cariniana legalis*, em condições de laboratório. Para Margatto e Royler (2009), em viveiro (Estufa) vermiculita e areia promoveram o maior desenvolvimento do comprimento da raiz e do nº de folhas comparando com os substratos; bagaço de cana e areia. No entanto as plantas crescem mais vigorosamente, quando cultivadas em solo floresta, com temperatura entre 20 e 30°C, o que pode ter alguma relação com a fertilidade química e as micorrizas do solo (CARVALHO, 2005; RÊGO, 2001).

Tabela 6 - Influência dos tipos de substrato; vermiculita (A), solo de floresta (B) na média de altura, nº de folhas, diâmetro e percentual de sobrevivência aos 30, 90 e 120 dias.

Parâmetros		Inicial	30 dias	90 dias	120 dias
Altura (cm)	(A)	6,1 a	6,7 b	9,3 b	10,4 b
	(B)	6,5 a	7,5 a	11,1 a	13,2 a
Nº de folhas	(A)	5,5 a	9,1 a	12,1 b	14,5 b
	(B)	5,1 a	7,6 b	14,7 a	19,5 a
Diâmetro (cm)	(A)	0,15 a	0,17 b	0,23 b	0,26 b
	(B)	0,16 a	0,19 a	0,27 a	0,31 a
Sobrevivência (%)	(A)	100 a	80 b	80 a	80 a
	(B)	100 a	100 a	80 a	80 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são estatisticamente significativas entre si, de acordo com o teste Scott-Knot ($p < 0.05$).

Fonte: Pedro Santos (2016).

Tabela 7 - Influência dos tipos de substrato; vermiculita (A) e solo de floresta (B) na taxa média de aumento em altura, nº de folhas, diâmetro e percentual de sobrevivência aos 30, 90 e 120 dias.

Aumento		30 dias	90 dias	120 dias
Altura (%)	(A)	9,82 b	52,46 b	70,66 b
	(B)	15,39 a	70,77 a	103,08 a
Nº de folhas (%)	(A)	65,47 a	120,50 b	163,64 b
	(B)	49,00 b	189,22 a	282,36 a
Diâmetro (%)	(A)	13,34 b	53,34 b	73,34 b
	(B)	18,02 a	67,71 a	93,76 a
Sobrevivência (%)	(A)	80 b	80 a	80 a
	(B)	100 a	80 a	80 a
Significância ANOVA				
Altura (%)		*	*	*
Nº de folhas (%)		*	*	*
Diâmetro (%)		*	*	*
Sobrevivência (%)		*	ns	ns

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são estatisticamente significativas entre si, de acordo com o teste Scott-Knot ($p < 0.05$). *Significante $p < 0.05$; ns, não significante.

Fonte: Pedro Santos (2016).

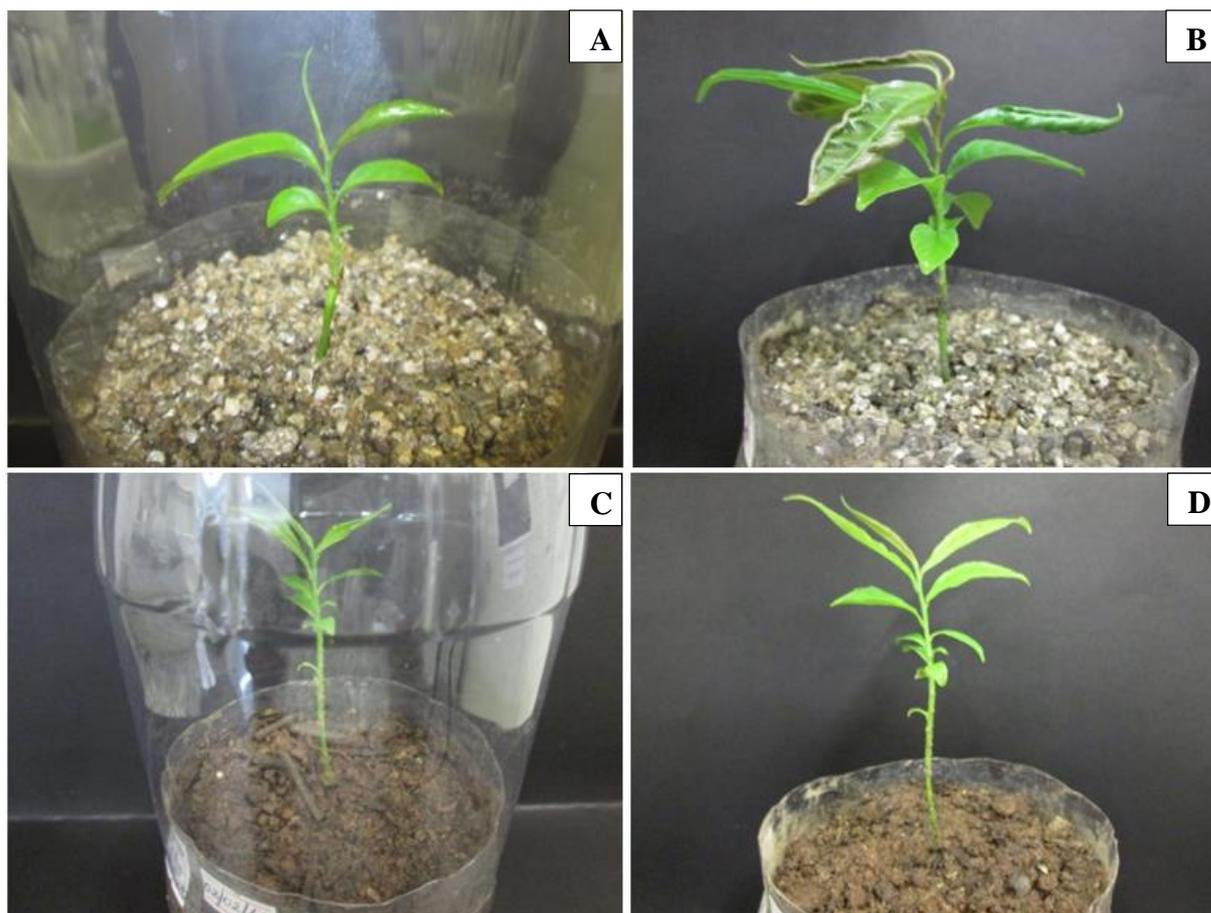


Figura 8 - Imagens ilustrativas de plantas de jequitibá-rosa: Em substrato vermiculita início da aclimatização(A), 30 dias após (B). Em substrato solo de floresta início da aclimatização (C), 30 dias após (D).

Fonte: Pedro Santos (2016).

4.5 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA

O germoplasma dos jequitibás-rosa foi conservado sob a forma de plantas e calos na sala de aclimatização e na sala de cultivo do Laboratório de Biotecnologia e Genotoxicidade (BIOGEN) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – MG.

4.5.1 Indução de calos

Aos 40 dias de cultivo a média de indução de calos por tipo de explante foi de 33.33% para segmentos cotiledonares e 30% para segmentos caulinares, não havendo diferença estatística entre eles. Os tratamentos combinando 0,54 ANA + 6,66 μ M BAP e 0,54 ANA + 13,32 μ M BAP apresentaram as melhores taxas médias, 70% e 80% respectivamente para os

segmentos cotiledonares ($p < 0.05$) (Tabela 8). A interação ANA x BAP e tipo de explante x ANA x BAP foi significativa para a indução de calos ($p < 0.05$) (Tabela 8).

Após 70 dias a média de aumento de massa fresca foi de 38,96% para segmentos cotiledonares e 5,84% para segmentos caulinares ($p < 0.05$) (Figura 9). Os explantes cotiledonares nos tratamentos combinando 0,54 ANA + 13,32 μM BAP e 0,54 ANA + 6,66 μM BAP apresentaram as melhores taxas médias, 76,76% e 122% ($p < 0.05$) (Figura 9). O tipo de explante, combinação ANA x BAP e interação tipo de explante x ANA x BAP foi significativa para o aumento de massa fresca ($p < 0.05$) (Tabela 8). Para os tratamentos sem a combinação de auxinas e citocininas não ocorreu calogênese nem aumento de massa fresca significativa. Segundo Ferreira et al. (2014), é necessário a correta combinação entre auxinas e citocininas para a calogênese de segmentos foliares de *Mammea americana* L.

Além de aos 40 dias a taxa de indução de calos não ter sido significativa por tipo de explante, os segmentos cotiledonares, juntamente com a interação dos fitoreguladores apresentaram os melhores resultados para as duas variáveis (Tabela 8). Para produção de calos em cupuaçu híbrido (*Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum*), Venturieri e Venturieri (2004) sugerem o uso de cotilédones como explantes, porque conseguiram a maior produção e frequência de calos. Estes resultados estão de acordo com os conseguidos por Ferreira et al. (2014) com *Mammea americana* L. e Behbahani et al. (2011) com *Barringtonia racemosa* que obtiveram a maior taxa de indução de calos em explantes foliares.

Tabela 8 - Efeitos do tipo de explante e concentrações de ANA (μM) com BAP (μM), na taxa média de indução de calos aos 40 dias e no aumento de massa fresca aos 70 dias.

Tratamentos	Explantes com calos aos 40 dias (%)	Aumento de massa fresca aos 70 dias (%)
Segmentos caulinares		
0,00 ANA + 0,00 BAP	0 a	0,00 a
0,00 ANA + 6,66 BAP	30 a	0,18 a
0,00 ANA + 13,32 BAP	40 a	9,29 a
0,54 ANA + 0,00 BAP	30 a	1,2 a
0,54 ANA + 6,66 BAP	40 a	16,29 a
0,54 ANA + 13,32 BAP	40 a	8,07 a
Segmentos cotiledonares		
0,00 ANA + 0,00 BAP	0 b	0,00 c
0,00 ANA + 6,66 BAP	10 b	0,00 c
0,00 ANA + 13,32 BAP	20 b	28,29 c
0,54 ANA + 0,00 BAP	20 b	6,77 c
0,54 ANA + 6,66 BAP	70 a	122,00 a
0,54 ANA + 13,32 BAP	80 a	76,76 b
Significância da ANOVA		
Tipo de explante (A)	ns	*
Auxina/Citocinina (B)	*	*
A x B	*	*

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são estatisticamente significativas entre si, de acordo com o teste Scott-Knot ($p < 0.05$). Interação entre tipo de explante x auxina/citocinina foi feita usando ANOVA. *Significante $p < 0.05$; ns, não significante.

Fonte: Pedro Santos (2016).

Os explantes foliares são os mais usados para a calogênese de plantas, devido à maior juvenilidade do tecido, maior superfície de contato com o meio e maior absorção dos nutrientes, por estas razões apresentam melhores resultados que os explantes de segmentos nodais.

Em estudos anteriores sobre calogênese em árvores da família Lecythidaceae, o meio WPM apresentou os melhores resultados tanto para explantes de sementes imaturas de *Bertholletia excelsa* H.B.K. segundo Dos Santos et al. (2013), quanto para explantes foliares de *Barringtonia racemosa* (BEHBAHANI et al., 2011).

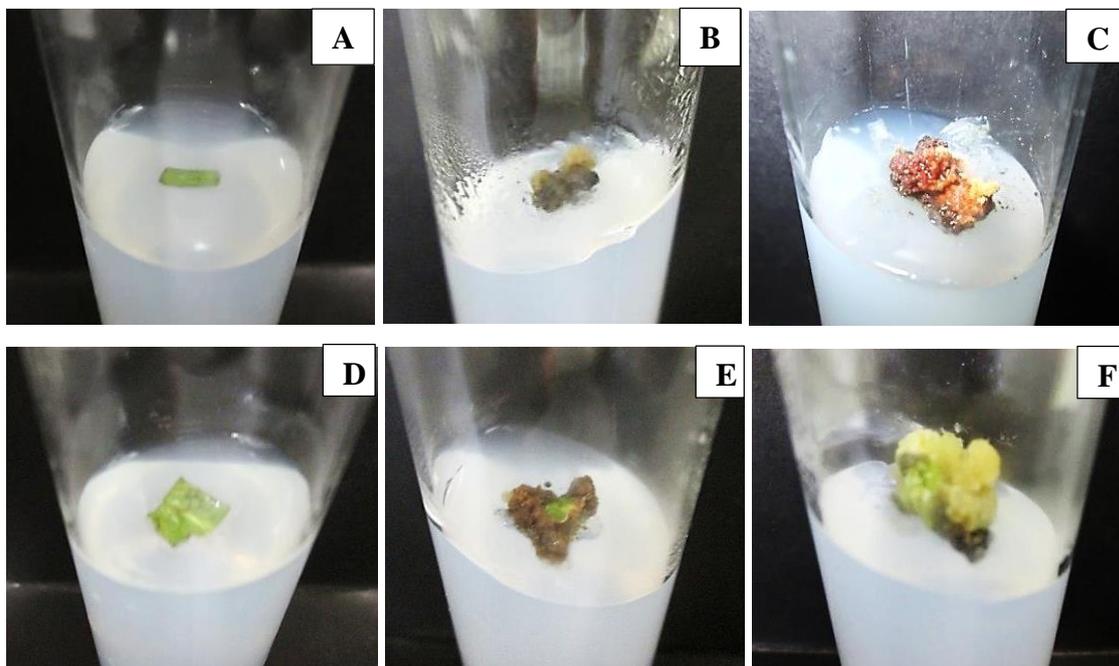


Figura 9 - Imagens ilustrativas de indução de calos em *Cariniana legalis*: Segmentos caulinares (A), aos 40 dias (B), aos 70 dias (C). Segmentos cotiledonares (D), aos 40 dias (E), aos 70 dias (F).

Fonte: Pedro Santos (2016).

Estes calos vão servir como fonte de germoplasma para estudos futuros sobre obtenção de brotos por via da organogênese indireta.

4.6 REGISTRO DA *Spilotes pullatus*

Durante a realização da segunda biometria e coleta de germoplasma na copa do jequitibá-rosa, em 26/07/2015, entre 15-15:30h, foram observadas e fotografadas duas serpentes caninanas (*Spilotes pullatus*), deslocando-se nos galhos entre 28 e 31 m de altura (ANEXO A, Figuras 3 a 8).

A primeira a ser avistada estava saindo de um oco da árvore no fuste secundário, a 28 m de altura em direção ao 4º galho. A serpente deslocou-se dos 28 para os 31 m de altura realizando movimentos ondulatórios sobre a casca rugosa do jequitibá (ANEXO A, Figura 4).

Quando a primeira serpente chegou no 4º galho a 31 m de altura e continuou a deslocar-se, foi avistada uma segunda serpente no mesmo galho, distante cerca de 10 m da intersecção do galho com o fuste secundário. A segunda caninana ficou parada e inflou o pescoço ao entrar em contato visual com a primeira a uma distância de aproximadamente 5 m entre elas. A primeira caninana também parou, levantou a cabeça e inflou o pescoço. Ambas permaneceram imóveis nessa postura durante cerca de 10 minutos e então a segunda serpente retornou para a ponta do galho em posição mais alta da copa e não foi mais observada. A primeira serpente permaneceu imóvel por mais 1-2 minutos e então retornou para o oco aproximadamente 15 minutos após ter saído (ANEXO A, Figuras 3 a 8).

A primeira serpente foi estimada em 203,32 cm de comprimento total e 5,35 cm de largura no meio do corpo. A segunda tinha 193,81 cm de comprimento e 5,10 cm de largura.

Este avistamento é cerca de três vezes maior que as maiores alturas registradas na literatura para *S. pullatus* na vegetação (HARTMANN et al., 2009; MARQUES; SAZIMA, 2004; MARQUES et al., 2014). Outro evento raro observado neste estudo foi o próprio encontro agonístico entre as duas serpentes. Isso já é um fenômeno pouco frequente, afirmam Marques et al. (2014), ainda mais associado a uma altura tão elevada. Outro aspecto que o presente estudo corrobora é a importância do jequitibá-rosa como hábitat disponível para outras espécies (CARVALHO, 2005; REIS; FONTOURA, 2009).

5 CONCLUSÕES

- Os cinco jequitibás-rosa desta pesquisa tem de biometria: DAP entre 1,51 m e 2,80 m; altura total entre 35,70 m e 50,00 m; idades entre 330 e 611 anos.
- Para a germinação de sementes de *Cariniana legalis in vitro* recomenda-se que estas fiquem imersas em água 48h e depois sejam inoculadas em meio MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose + 14,45 μM GA₃.
- As plantas aclimatizadas em substrato solo floresta apresentaram as maiores taxas de crescimento aos 90 e 120 dias após o início da aclimatização em relação às plantas cultivadas em substrato vermiculita.
- Para indução de calos em *Cariniana legalis* recomenda-se usar explantes cotiledonares cultivados em meio WPM, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e a seguinte combinação de fitohormônios: 0,54 ANA + 6,66 μM BAP.
- Conseguiu-se conservar o germoplasma dos jequitibás sob a forma de plantas e calos, tendo assim, fonte de explantes para futuras propagações.
- A escalada para a realização do trabalho proporcionou o registro inédito de um encontro agonístico entre dois indivíduos de *Spilotes pullatus* (Serpentes, Colubridae) a 31m de altura na copa do jequitibá-rosa da cachoeira de Machado.
- Recomenda-se que esta pesquisa continue, para que se obtenham mudas via multiplicação *in vitro* e organogênese indireta.
- Devem ser elaborados projetos de Educação Ambiental para escolares e a comunidade, com o objetivo de divulgar a importância ambiental da *Cariniana legalis*.
- Projetos de extensão universitária devem ser realizados para evitar a fragmentação florestal, fazer o reflorestamento da espécie e o aumento das suas populações.
- As plantas obtidas nesta pesquisa devem ser plantadas em áreas de preservação ambiental, para que desta forma se possa fazer a extensão deste trabalho para a comunidade.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442 p.
- _____. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 442 p.
- AGUIAR, F. H. et al. Harpy eagle sightings, traces and nesting records at the “reserva Natural Vale”, a Brazilian atlantic Forest remnant in espírito Santo, Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology**, n. 8, p. 20-48, 2013.
- BEHBAHANI, M.; MEHRNAZ SHANEHSAZZADEH, M.; HESSAMI, M. J. Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 1, p. 69-76, 2011.
- BORÉM, R. A. T.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Fitossociologia do estrato arbóreo em uma topossequência alterada de Mata Atlântica, no município de Silva Jardim-RJ, Brasil. **Revista Árvore**, v. 26, n. 6, p. 727-742, 2002.
- BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R.; Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. **Food Chemistry**, n. 139, p. 695-701, 2014.
- CARVALHO, P. E. R. **Jequitibá-Rosa: Circular Técnica**. Colombo, PR: Embrapa – SPI, 2005. 10 p.
- _____. **Espécies arbóreas brasileiras**. 2. ed. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2006. 627 p.
- DOS SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; DA SILVA CARVALHO, S. M. Callus induction in *Bertholletia excelsa* immature seeds. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 4, 2013.
- ENCINAS, J. I.; SILVA, G. F.; TICHETTI, I. Variáveis dendrométricas: Universidade de Brasília. Departamento de Engenharia Florestal. **Comunicações técnicas Florestais**, Brasília, v. 4, n. 1, 2002. 102 p.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.
- FERREIRA, D. F. Sisvar a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- FERREIRA, M. G. R. et al. Callogenesis in leaf segments of *Mammea americana* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2014.
- FLOWER, A.J.P.; BIANCHETTI, A. Dormência em sementes florestais. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 27 p. (**Embrapa Florestas. Documentos, 40**).

GATTI, K. C. **Propagação vegetativa de pau mulato (*Calycophyllum spruceanum* (benth) k.schum.), jequitibá (*Cariniana estrellensis* (raddi) kuntze) e teca (*Tectona grandis* linn. f.) por miniestaquia.** 2002. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

_____. Propagação vegetativa de jequitibá *cariniana estrellensis* (raddi) por miniestaquia. **Temas Agrários**, v. 16, n. 2, p. 54-63, Jul./Dec. 2011.

GUIDUGLI, M. C. et al. Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite marker for the giant tropical tree *cariniana legalis* (Lecythidaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 5, Sep./Oct. 2013.

HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T.; MARTINS, M. Ecology of a snake assemblage in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 49, n. 27, p. 343-360, 2009.

INSTITUTO CABRUCÁ. **Nota técnica 01/2014.** “Maior Jequitibá do Brasil”.

IUCN (2012). **Internacional Union for Conservation of Nature Red List Threatened Species.** Version 2012. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 10 Oct. 2014.

LEAL, J. B.; SANTOS, R. P.; GAIOTTO, F. A. Effect of selective logging on diversity and gene flow in *Cariniana legalis* sampled from a cacao agroforest system. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 626-635, 2014.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators Society**, n. 30, p. 421-327, 1981.

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

LUZ, J. M. Q. et al. Estabelecimento *in vitro* e aclimatização de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, Campinas, v. 16, n. 2, supl. L., p. 444-449, 2014.

MARGATTO, A. K. R.; ROYLER, M. R. Germinação da semente e desenvolvimento inicial de *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (Lecythidaceae) submetida a diferentes substratos. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 101-113, mai./ago. 2009.

MARQUES, O. A. V. et al. Ecology of the colubrid snake *Spilotes pullatus* from the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 70, n. 4, p. 407-416, 2014.

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. História natural dos répteis da Estação Ecológica Juréia-Itatins. In: Marques, O. A. V., Duleba, W. (Eds.). Estação Ecológica Juréia-Itatins. **Ambiente físico, flora e fauna**, Ribeirão Preto: Holos, p. 257-277, 2004.

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. E. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 6, n. 2, p. 78-150, 1998.

MEDEIROS, A. C. S.; CHODOR, J.; BULGACOV, A. Coleta de sementes em Árvores Altas: **Dados eletrônicos. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.**

MEDEIROS, A. C. S.; NOGUEIRA, A. C. **Planejamento da coleta de sementes florestais nativas:** circular técnica 126. Colombo, PR, 2006.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Lecythidaceae: família da castanha-do-pará. Ilhéus: CEPLAC, 1983. 35p. (**CEPLAC. Boletim técnico, 116**).

MÜLLER, A. et al. Growing poplars for research with and without mycorrhizas. **Frontiers in Plant Science**, Germany, v. 4, n. 332, p. 1-11, aug. 2013.

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

PEIXOTO, A. L.; ROSA, M. M. T.; JOELS, L. C. M. Diagrama de perfil e de cobertura de um trecho da floresta de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 177-193, 1995.

PETZL. Equipment, headlamps, and techniques for alpinisme. **Professional; Tree care**. 2015. Disponível em: <<https://www.petzl.com/GB/en/Professional/Tree-care#.VtwwADbSnIU>>. Acesso em: 20 Feb. 2015.

PILATTI, F. K. *et al.* *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brasil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Springer, 2010.

PONTES, J. A. L.; ROCHA, C. F. D. **Serpentes da Serra do Mendanha, Rio de Janeiro, RJ:** ecologia e conservação. Rio de Janeiro: Technical Books Editora. 2008.

RASBAND. **Rasband, W.S. (2012): Image J.** United States National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 2012.

RÊGO, G. M. Ecofisiologia do Jequitibá-rosa e do Jacarandá-da-Bahia: Morfogênese, Germinação e Crescimento inicial. 2001. **Tese de Doutorado (Ciências Agrárias)** – Universidade Federal do Paraná.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. Recomposição Florestal: Cultivo do jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*). Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. 24p. (**Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 25**).

_____. Efeito do Substrato e da Temperatura Sobre a Germinação e Vigor de Sementes do Jequitibá-Rosa (*Cariniana legalis*). **Comunicado técnico**. Colombo, PR. Dezembro, 2004.

_____. Efeito do Sombreamento sobre o Teor de Clorofila e Crescimento Inicial do Jequitibá-rosa. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.53, p. 179-194, jul./dez. 2006.

REIS, J. R. M.; FONTOURA, T. Diversity of epiphytic bromeliads in the Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra do Teimoso-Jussari, BA. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 1, jan./mar. 2009.

REITZ, R. **Lecitidáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1981. 32 p. (Flora ilustrada catarinense).

RIZZINI, C. T. **Árvores e Madeiras Úteis do Brasil**. Manual de Dendrologia brasileira. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1971. 294 p.

ROCHA, S. C. et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 1, n. 1, p. 43-50, 2007.

RODRIGUES, B. P. et al. *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (Lecythidaceae): Descrição dendrológica e anatômica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 419-427, 2012.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagação do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 28, n. 2, p. 293-296, ago. 2006.

SANTOS, M. R. A. et al. Estudos sobre superação de dormência em sementes de *Smilax japecanga* GRISEBACH. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 319-324, mar./abr., 2003.

SARTORI, R. A. et al. Structural and floristic variations of the arboreal component of a montane semideciduous forest in Socorro, SP. **Rodriguésia**, v. 66, n. 1, p. 33-49, 2015.

SHEKHAWT M. S.; MANOKARI M. In vitro propagation, micromorphological studies and *ex vitro* rooting of cannon ball tree (*Couroupita guianensis* aubl.): a multipurpose threatened species. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Springer, 2016.

TAMBARUSSI, E. V. et al. Paternity analysis reveals significant isolation and near neighbor pollen dispersal in small *Cariniana legalis* Mart. Kuntze populations in the Brazilian Atlantic Forest. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 23, p. 5588-5600, 2015.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, v. 1, 1998. 509 p.

TREE CLIMBERS. International. **Technique**. 2015. Disponível em: <<http://treeclimbing.com/index.php/climbing/technique>>. Acesso em: 10 Mar. 2015.

UIAA. Union Internationale des Associations d'Alpinisme. 2015. Disponível em: <<https://www.theuiaa.org/uiaa-safety-label/>>. Acesso em: 26 Feb. 2015.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae)¹. **Acta amazônica**, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.

VIEIRA, M. C. W. **Fitogeografia e conservação em florestas em Monte Belo, Minas Gerais: estudo de caso: Fazenda Lagoa**. 1990. 129 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1990.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 279 p.

ANEXOS

ANEXO A - Artigo submetido à Revista Herpetology Notes. Qualis B2.

A Tree climbing technique records agonistic behavior between two individuals of *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Serpents, Colubridae) on top of a *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, at 31 m tall.

Autores: Pedro Miguel Domingues dos Santos, Vinicius Xavier da Silva e Breno Régis Santos.

A tree climbing technique records agonistic behavior between two individuals of *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Serpents, Colubridae) on top of a *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, at 31 m tall.

Pedro Miguel Domingues dos Santos^{1,3}, Vinicius Xavier da Silva² and Breno Régis Santos^{1,3,*}

¹Universidade Federal de Alfenas. Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Centro – Alfenas-MG, 37130-000, Brazil. Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais

²Coleção Herpetológica Alfred Russel Wallace (CHARW) - Universidade Federal de Alfenas.

³Laboratório de Biotecnologia e Genotoxicidade Vegetal – Universidade Federal de Alfenas.

* Corresponding author: sbrenoregis@gmail.com

Abstract: This paper describes a climbing technique in tall trees, which enabled the recording of an agonistic encounter between two individuals of *Spilotes pullatus* (Serpentes, Colubridae) at 31 m high in the top of a jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze). The measurement of the tree and the observation of the snakes occurred in a fragment of semi deciduous seasonal forest of the Atlantic Forest in the southern state of Minas Gerais, southeastern Brazil. The biometry of two serpents was estimated from the photographic record, which extends three times the greatest height ever recorded for the sighting of this colubrid.

Keywords: Caninana, Atlantic Forest, Jequitibá-rosa, Forest fragment, Canopy.

INTRODUCTION

The development of new technologies and the pioneer profile of certain researchers provide access to environments previously considered unreachable. When these new worlds start to be explored, numerous scientific discoveries begin to appear. It was like that with the space conquest, the ocean depths and it is not different with the tree tops. Forests have already been studied for decades and we are still far from understanding them, let alone its canopy, which is the last stratum of such a complex environment to be explored by man (Perry, 1991). The Brazilian Atlantic Forest is one of those most endangered forest environments in the world. It is home to numerous endemic species in the fauna and flora and is the natural habitat of several endangered species (Borem and Oliveira-Filho, 2002). As a result of this accelerated destruction by human causes, much of the biodiversity in this biome has been lost even before being discovered.

In addition to species still unknown to science in the highest portion of forests we also ignore many interactions or other aspects of the natural history even of relatively common species. One of those species is the caninana serpent (*Spilotes pullatus*), considered one of the most abundant colubrids in the southeastern Atlantic Forest (Freitas, 2003). Despite its abundance, a work gathering several evidences on its ecology has only been published recently (Marques et al., 2014). Before that, the reports about the natural history of this species were sparse or without much detail (Vanzolini et al, 1980; Sazima and Haddad, 1992; Martins and Oliveira, 1998; Freitas, 2003; Marques and Sazima, 2004; Esberard and Vrcibradic, 2007; Hartmann et al, 2009; Mendonça et al, 2011). Regarding its diet, for example, it has already been considered a specialist in birds (Amaral, 1978; Cunha and Nascimento, 1978), a generalist that consumes amphibians, lizards, birds and their eggs and mammals (Martins and Oliveira, 1998) and more recently, it has shown some preference for endothermic preys such as eggs, bats and juvenile birds, rodents and marsupials (Marques and

Sazima, 2004; Esberard and Vrcibradic, 2007; Mendonça et al, 2011; Marques et al, 2014). As for the use of space, this serpent has been classified as arboreal some times (Vanzolini et al, 1980; Martins and Oliveira, 1998; Freitas, 2003); and other times, as sub or semi-arboreal (Sazima and Haddad, 1992; Marques and Sazima, 2004). In the latter case it was registered a larger frequency of snake observations on the ground than in trees (Marques and Sazima, 2004; Hartmann et al., 2009).

Among the findings in the top of trees, the highest records do not exceed 10 m high. One of them took place in Panama and the snake slept for three days and presumably ate nestlings of *Trogonolivacea* in a nest of this bird built in an Azteca ant nest (Robinson and Robinson, 2001). Another record was in Picinguaba, southeastern Brazil, and the snake was just over 10 m high (Hartmann et al., 2009). In another sighting, the snake was observed in Juréia-Itatins, southeastern Brazil, preying nestlings of *Trogon* sp in the nest, approximately 10 m from the floor too (Marques and Sazima, 2004; Marques et al, 2014). Some diet items (eggs, bats and juvenile birds) reinforce not only the arboreal behavior of *Spilotes pullatus* but also its active foraging habit. However, other items (land rodents and marsupials) show predatory activity on the ground. Another aspect of diet that can enhance the arboreal behavior is the larger frequency of relatively small prey in relation to the big size of *Spilotes pullatus* (4.1-12.9% of the biomass of the snake). According to some authors, relatively small prey may be advantageous for the arboreal behavior since heavy items in its stomach can hinder the climbing on the vegetation (Marques et al., 2014).

Natural records of two individuals in the field, either of couples pairing or fighting between males, are also rare. There is a report of five encounters in the Atlantic Forest in southeastern Brazil: one in the vegetation and four on the ground (Marques et al, 2014). However, the least frequency of events on the top of the vegetation may be simply due to the

shortest observation time of this layer or the lack of suitable methods for this observation. Events at high altitudes in the tree tops must be more common than we think.

The aim of this study was to use the climbing technique in tall trees to measure the jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart) O. Kuntze.), which allowed the spontaneous record of the encounter between two caninanas, as well as the accomplishment of the two snakes biometry.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The record was made in a *Cariniana legalis* individual located in the forest fragment (21°35'12.7" S, 45°59'37.2" W, and 870 m in altitude) near a waterfall, located in the countryside of Rosental, municipality of Machado - MG (Figure 1). In this fragment a population of jequitibás-rosa ≥ 15 adults, with ≥ 20 m high was observed.

Target species

The tree where the two snakes were recorded is a *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, commonly known as jequitibá-rosa belonging to Lecythidaceae family (Figure 1). They are semideciduous trees, heliophytic, typical of broadleaved deciduous forests. Commonly they are 30 to 50 m in height, with vertical and cylindrical stem diameter from 70 to 120 cm, coated with brownish and fissured bark. They are found in the states of Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro and Espírito Santo, both in the Atlantic rain forest and the semi-deciduous broad leaf of altitude and the Paraná basin (Lorenzi, 2008).

In the Brazilian Atlantic Forest, the *C. legalis* is considered the highest species of trees, reaching more than 60 m in height (Tambarussiet al. 2015) and 4 m in diameter at breast height (Guidugli et al., 2010). One of the largest and most long-lived trees of the Neotropical

biomes that may exceed 500 years (Carvalho, 2003). It is included in the list of species prone to extinction in vulnerable category (IUCN, 2012). Its flowers are hermaphroditic and pollinated by bees and its seeds are dispersed by zoochory and anemochory.

To obtain seeds, the fruit must be gathered directly from the tree top, then they must stay in the sun to complete the spontaneous opening and release the seeds (Carvalho, 2003; Lorenzi, 2008).

It is a raceme tree with wide and globular crown, umbrella-shaped, with horizontal branches, supporting many orchids, bromeliads and cacti (Carvalho, 2005). Large jequitibás are therefore important for maintaining the diversity of epiphytes species, hosting these forms of life in greater abundance and exclusivity than other arboreal species (Reis and Fontoura, 2009). Thus they are habitats for wide varieties of insects, birds, reptiles and primates that feed and breed in their top. In 1992, for example, a harpy's nest was observed (*Harpy harpyja*) on the main fork of the top of a *C. legalis*, at 30 m from the ground (Aguiar-Silva et al., 2012). The tree was 36 m tall and had 1.1 m DBH, located in the Reserva Natural Vale in Linhares, ES. In the south of Minas Gerais, large jequitibás-rosa are still found inside native or isolated forest fragments in the middle of a matrix.

The snakes observed in this *C. legalis* belong to the *Spilotes pullatus* species, also known as caninana. It is one of the largest colubrids found in South America and may exceed 250 cm in total length (Marques et al., 2014). It is predominantly black in the head and on the back, with stripes and yellow spots. The belly is yellowish with black spots, the head is slightly distinct from the neck, except when it is inflated. Its eyes are large, dark and with round pupils, indicating the diurnal habit. Its dentition is aglyphous, so it is not poisonous. Under threat it inflates the neck and vibrates its tail and, when captured, it is aggressive and can bite (Bridges and Rock, 2008).

The subspecies of *Spilotes pullatus* described in the literature have not gone through a taxonomic revision (Vanzolini et al., 1980), at least not regarding the Brazilian territory. Two of them are still officially recognized in the country (Costa and Bérnils, 2015): *Spilotes pullatus pullatus* (Linnaeus, 1758) seems to be the predominant form in Brazilian central-north and northeast (Peters and Orejas-Miranda, 1970; Vanzolini et al., 1980) while *Spilotes pullatus anomalepis* Bocourt (1888) would be the form in southeastern Brazil (Peters and Orejas-Miranda, 1970). The subspecies *Spilotes pullatus maculatus* Amaral (1929), considered a typical form of the southeast by Freitas (2003), is according to some (Abe and Fernandes, 1977) just a morpho of *S. p. anomalepis* (Uetze Hošek, 2016). Thus, depending on the study area, the two specimens recorded in this study belong to the *Spilotes pullatus anomalepis* form.

Climbing technique

The climbing to the tree was carried out by an expert climber in dendrobiometry (PMDS), with a support team consisting of two trained people (Medeiros and Nogueira, 2006). A bow of 50 pounds of power was used to shoot an arrow weighing 100 g at the end where a nylon wire of 0.90 mm (Figure 2A) was tied. After the wire ran through the branch, a rope of 4 mm was tied to it which, in its turn, was connected to the main rope measuring 11mm. After confirmed the branch's resistance to withstand the rise, was installed the ascending line and the climbing technique with a single rope is used to reach the tree top (Medeiros et al., 2007) (Figure 2B). This method enables greater mobility, without damaging the trees and it allows access to the peripheral branches. On the canopy, the displacement was done through traverse line, tyrolean traverse, pendulum and horizontal progression with the use of ascenders; it was used the climbing with single and double rope to reach the highest branches (Petzl, 2015). The descending was done by rappelling using double rope.

The climbing equipment used was: a recurved bow Touchwood® with 50 pounds of power, carbon fiber arrow Easton® spin 350, weight of 100 g, 100 m of 0.90 mm nylon wire, 120 m of 4 mm rope, 100 m of 11 mm static rope, 50 m of 11 mm dynamic rope, ascenders, descenders, pulleys, climbing harnesses, chest harnesses, step etriers, helmets, carabiners, express slings and accessory cords. The photographs were taken with two cameras: a professional Canon®, T3i model, 18-55 mm lens and another Canon®, PowerShot A2500 model and 5-25 mm lens. A binoculars Bushnell®, 13-7016 model with 7-15x35 mm was also used.

Tree biometry and age

In the fragment under study was chosen for biometrics the *C. legalis* individual that presented visually larger dimensions. This tree was mapped by GPS, photographed and registered. After authorization before the owners and the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). The individual's biometrics was carried out and the measures were the following: circumference at breast height or at 130 cm from the floor (CBH), diameter at breast height (DBH), total height, the primary shaft height, crown height, crown diameter and diameter of the trunk between the 2nd and 4th branches. To measure the CAP, we used the tape method, according to which the diameter is measured at 130 cm above the floor, the upper side of the tree in places with slopes (Encinas et al., 2002). The DBH was calculated using the following formula: $DBH = CBH / \pi$.

Two methods were used to measure the variables in total height, in height of the main shaft and in the top height: dendrometric clipboard, which calculates the height of the tree by similar triangles (Encinas et al., 2002) and by the climbing. In the latter, the climber punctually took the tree data and measured the overall height, the main shaft height and height of the top with a 50 m tape.

The equipment used to make the tree biometry was a professional 50 m tape IRWIN®, a 5 m tape, chalk, a dendrometric clipboard and biometric sheets.

The age of the tree was estimated based on comparison with Circumference increment rates at yearly 14.4 mm breast height, according to Maria (2002).

Snakes biometry

The biometrics of snakes spotted in *C. legalis* was performed with the aid of Image J version 1:48 software (Rasband, 2012), through which the caninanas recorded in photographs were measured by comparison with a known measure of the tree as a standard. The measure used was the diameter of the trunk of 140 cm, which was obtained at 30 cm below the hollowness between the 2nd and 4th branches. Based on these figures, the diameters of the trunk and branches with the total length and wide in the middle of the snakes' body were correlated. There were five full-length and middle of the body's measurements for each snake and afterwards the averages were calculated.

RESULTS

The *C. legalis* specimen showed the following biometric data: 6.60 m of CBH, 2.10 m of DBH, total height of 36.8 m, 22.50 m of shaft height, 14.30 m of crown height, the trunk diameter was 30 cm below the hollowness between the 3rd and 4th branches of 1.40 m, 27.2 m of crown diameter. The estimated age was 458 years. Those measurements were performed twice: on 16 March 2015 and on 26 July 2015.

During the performance of the second biometrics in the *C. legalis* crown, on 26 July 2015, between 3:00 and 3:30p.m., two caninana snakes were observed and photographed (*Spilotes pullatus*), moving on the branches between 28 and 31 m in height (Figures 3 to 8).

The first one to be spotted was leaving a hollow tree on the trunk, at 28 m from the ground towards the 4th branch (Figure 3). The snake shifted from meter 28 to 31 performing undulations on the rough jequitibá bark (Figure 4).

When the first snake arrived on the 4th branch at 31 m high and continued moving (Figure 5), a second snake was spotted on the same branch (Figure 6), at a distance of about 10 m from the branch intersection with the trunk. The second caninana stood still and puffed out its neck when it got in visual contact with the first one at a distance of approximately 5 m between them (Figure 7). The first caninana also stopped, raised its head and puffed its neck. Both remained motionless in this posture for about 10 minutes and then the second snake returned to the end of the branch on the highest tree top position and was no longer observed. The first snake remained still for 1-2 minutes and then returned to the hollowness about 15 minutes after leaving (Figure 8).

It was estimated that the first snake was 203.32 cm long in total and 5.35 cm wide in the middle of the body. The second one was 5.10 cm wide in the middle of the body, but it was not possible to estimate the total length because part of its body was hidden by the branch of the tree. The second serpent was correlated to the length and width of the first, thereby obtaining the total estimated length of 193.81 cm.

DISCUSSION

The climbing technique applied enabled the record of an encounter between two agonistic caninanas at approximately 31 m high on a 36.8 m *C. legalis*. One of them, after the encounter, went up to an even higher position on the tree, which shows the ability and the adjustments of this snake to arboreal life. This sighting is about three times larger than the highest altitudes recorded in the literature for *S. pullatus* vegetation (Robinson and Robinson, 2001; Marques and Sazima, 2004; Hartmann et al, 2009; Marques et al, 2014). Another rare

event observed in this study was the very agonistic encounter between two serpents. This is already an uncommon phenomenon (Marques et al., 2014), mainly associated with such high altitude.

Another aspect that this study confirms the importance of the *C. legalis* as a habitat available for other species (Carvalho, 2005; Reis and Fontoura, 2009). During the 1st research in a tree top on 15 March 2015, time of its flowering, the hollowness from where the first caninana left, was inhabited by native bees. Only during the second climbing to this tree, on 26 July 2015, were the two snakes spotted; one of them went out of the same hollowness. It is possible that the two snakes were inhabiting the jequitibá-rosa top, or at least seasonally occupying the tree at the fruiting time which attracts birds that feed on the fruit and/or nest in this environment. In fact, juvenile and adult bird eggs are an important component of their diet (Marques et al., 2014) and may be the reason for them to rise so high in a tree. The other reasons, not necessarily mutually excluding, can be protection from predators or decrease in competition with other large predators, which can be rare in tree tops.

Evidence in favor of a *S. Pullatus* tree life is now even stronger. Sometimes regarded as sub-arboreal (Sazima and Haddad, 1992) or semi-arboreal (Marques and Sazima, 2004), doubts about their preferred habit may be due to much larger frequency of observations on the ground than in trees (Marques and Sazima, 2004; Hartmann et al., 2009; Marques et al., 2014). Five observations in nature, one of the present authors (VXS) recorded four on the floor and only at about three meters high in the vertical trunk of a tree with about seven meters high. Even so, the spotted snake apparently climbed the tree during the escape behavior. The fact is that this snake uses both environments well (Marques et al., 2014). If there was already plenty of evidence of land use by *S. pullatus*, one cannot deny the importance of the report of two subjects at the canopy of a tree more than 30 meters high. But we can ask ourselves how these specimens arrived there.

There are two possibilities to explain how *S. pullatus* reached the canopy of the tree. First we assume that the serpents rose through the main trunk using their ventral scales as claws into the bark and making undulations of the body on the trunk of 2.10 meters in diameter. The *C. legalis* has a cylindrical and vertical body, coated by a brownish, rough and deeply grooved bark, up to 50 mm thick, (Carvalho, 2005; Lorenzi 2008), which facilitates the adherence of its ventral sides. The second possibility would include access by adjacent trees of smaller diameter and height that communicate with the *C. legalis* canopy at certain points. This strategy was observed in the same tree with capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*) in 2014.

The other rare event recorded in this work can be characterized as a likely agonistic encounter between two males. That encounter has not led to a physical clash, since the second male spotted, after finding the first one, dropped back to the end of the branch and was not seen again. But their lifting the front of the body and inflating the neck postures characterizes the typical aggressiveness of this species (Bridges and Rock, 2008). It was not observed, however, the tails intertwining recorded for this species and for *Chironius bicarinatus* (Almeida-Santos and Marques, 2002; Muniz-da-Silva and Almeida-Santos, 2013; Marques et al, 2014.). The vertical lifting of the anterior portion of male bodies in combat was also found in other South American colubrids (*Drymoluber*, *Leptophis*, *Mastigodryase Pseustes*) but not in other colubrids outside South America (Bogert and Roth, 1966; Capula and Luiselli, 1997). As the South American colubrids apparently form a monophyletic group (Hollis, 2006; Marques et al (2014) proposed the hypothesis that raising the anterior portion of the body during the fighting between males can be a characteristic shared by this clade. This hypothesis, however, still needs to be tested.

This record is the first encounter in a *C. legalis* of this size, demonstrating that this species plays an important role in maintaining the wealth of other community species. This

reinforces the need for protection to these trees, as well as to its fragments where they are located.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for its financial support. To Elisabeth Jaurêta and Maria Amândia for the tree climbing equipment. To Francisco Siqueira, Lucas de Souza and Alexandre Soares for their support during the climbing. To Milena da Silva for her help in the biometrics of serpents and to Marco Aurélio for editing the photographs.

REFERENCES

- Abe, A.S., Fernandes, W. (1977): Polymorphism in *Spilotes pullatus Bocourt* (Reptilia, Serpentes: Colubridae). *Journal of Herpetology*, **11(1)**: 98-100.
- Aguiar-Silva, F.H., Sanaiotti, T.M., Jaudoin, O., Srbek-Araujo, A.C., Siqueira, G., Banhos, A. (2012): Harpy Eagle sightings, traces and nesting records at the “Reserva Natural Vale”, a Brazilian Atlantic Forest remnant in Espírito Santo, Brazil. *Revista Brasileira de Ornitologia*, **20(2)**: 148-155.
- Almeida-Santos, S.M., Marques, O.A.V. (2002): Male-male combat in the colubrid snake *Chironius bicarinatus* from the Atlantic Forest, southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, **23**: 528-533.
- Amaral, A. (1978): *Serpentes do Brasil*. Brasil. Editora Universidade de São Paulo e Melhoramentos.
- Bogert, C.M., Roth, V.D. (1966): Ritualistic combat of male gopher snakes *Pituophis melanoleucus affinis* (Reptilia, Colubridae). *American Museum Novitates*, **2245**: 1-27.

- Costa, H.C., Bérnils, R.S. (Org.) (2015): Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Available at www.sbherpetologia.org.br. Last accessed on 05 July 2016.
- Borém, R.A.T., Oliveira-Filho, A. (2002): Fitossociologia do estrato arbóreo em uma topossequência alterada de Mata Atlântica, no município de Silva Jardim-RJ, Brasil. *Revista Árvore*, **26(6)**: 727-742.
- Capula, M., Luiselli, L. (1997): A tentative review of sexual behavior and alternative reproductive strategies of the Italian colubrid snakes. *Herpetozoa*, **10**: 107-119.
- Carvalho, P.E.R. (2003): Espécies arbóreas brasileiras. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica.
- Carvalho, P.E.R. (2005): Jequitibá-Rosa. Embrapa Florestas. Circular Técnica, **107**: 1-10.
- Cunha, O.R., Nascimento, F.P. (1978): Ofídios da Amazônia. X. As cobras da região leste do Pará. *Publicações Avulsas do Museu Paraense Emílio Goeldi*, **32**: 1-328.
- Encinas, J.I., Silva, G.F., Tichetti, I. (2002): Variáveis dendrométricas. Brasília. Universidade de Brasília. Departamento de Engenharia Florestal. Comunicações Técnicas Florestais V.4, N.1.
- Esbérard, C.E., Vrcibradic, D. (2007): Snakes preying on bats: new records from Brazil and a review of recorded cases in the Neotropical Region. *Revista Brasileira de Zoologia*, **24(3)**: 848-853.
- Freitas, M.A. (2003): Serpentes Brasileiras. Bahia. Lauro de Freitas.
- Guidugli, M.C., Accoroni, K.A.G., Mestriner, M.A., Contel, E.P.B., Martinez, C.A., Alzate-Marin, A.L. (2010): Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). *Genetics and Molecular Biology*, **33**: 131-134.

- Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., Martins, M. (2009): Ecology of a snake assemblage in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, **49(27)**: 343-360.
- Hollis, J.L. (2006): Phylogenetics of the genus *Chironius* Fitzinger, 1826 (Serpentes, Colubridae) based on morphology. *Herpetologica*, **62**: 435-453.
- IUCN (2012): Internacional Union for Conservacion of Nature Red List Threatened Species. Version 2012. Available at <http://www.iucnredlist.org>. Last accessed on 10 October 2014.
- Lorenzi, H. (2008): Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5.ed. Vol. 1. Nova Odessa. Plantarum. 384p.
- Maria, V.R.V. (2002): Estudo da periodicidade do crescimento, fenologia e relação com a atividade cambial de espécies arbóreas tropicais de florestas estacionais semidecíduas. Unpublished MSc Diss., Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 126p.
- Marques, O.A.V., Muniz-da-Silva, D.F., Barbo, F.E., Cardoso, S.R.T., Maia, D.C., Almeida-Santos, S.M. (2014): Ecology of the colubrid snake *Spilotespullatus* from the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. *Herpetologica*, **70(4)**: 407-416.
- Marques, O.A.V., Sazima, I. (2004): História natural dos répteis da Estação Ecológica Juréia-Itatins. In: Marques, O.A.V., Duleba, W. (Eds.). Estação Ecológica Juréia-Itatins. Ambiente físico, flora e fauna. pp. 257-277. Ribeirão Preto. Holos.
- Martins, M., Oliveira, M.E. (1998): Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History*, **6(2)**: 78-150.
- Medeiros, A.C.S., Nogueira, A.C. (2006): Planejamento da coleta de sementes florestais nativas. Colombo, PR. Circular Técnica 126.
- Medeiros, A.C.S., Chodor, J., Bulgacov, A. (2007): Coleta de sementes em árvores altas: dados eletrônicos. Colombo, PR. Embrapa Florestas.

- Mendonça, P.P, Cobra, P., Bernardo, L.R., Silva-Soares, T. (2011): Predation of the snake *Spilotes pullatus* (Squamata: Serpentes) upon the rodent *Proechmys gardneri* (Rodentia: Echimyidae) in the Amazonian basin, northwestern Brazil. *Herpetology Notes*, **4**: 425-427.
- Perry, D. (1991): *A vida na copa da floresta*. São Paulo. Editora Interação.
- Peters, J.A., Orejas-Miranda, B. (1970): Catalogue of Neotropical Squamata Part I. Snakes. *Bulletin of the United States National Museum*, **297**: 1-347.
- Petzl (2015): Equipment, headlamps, and techniques for alpinisme. Professional Tree care. Available at <http://www.petzl.com/GB/en/Professional/Tree-care#VtwwADbSnIU>. Last accessed on 20 February 2015.
- Pontes, J.A.L., Rocha, C.F.D. (2008): *Serpentes da Serra do Mendanha, Rio de Janeiro, RJ: ecologia e conservação*. Rio de Janeiro. Technical Books Editora.
- Rasband, W.S. (2012): Image J. United States National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Reis, J.R.M., Fontoura, T. (2009): Diversity of epiphytic bromeliads in the Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra do Teimoso-Jussari, BA. *Biota Neotropica*, **9(1)**: 73-79.
- Robinson, W.D., Robinson, T.R. (2001): Observations of predation events at BIRD nests in Central Panama. *Journal of Field Ornithology*, **72(1)**: 43-48.
- Sazima, I., Haddad, C.F.B. (1992): Répteis da Serra do Japi: notas sobre história natural. In: Morellato, L.P.C. (org.). *História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil*. pp. 212-236. Campinas, SP. Editora da UNICAMP/FAPESP.
- Tambarussi, E.V., Boshier, D., Vencovsky, R., Freitas, M.L.M., Sebbenn, A.M. (2015): Paternity analysis reveals significant isolation and near neighbor pollen dispersal in small *Cariniana legalis* Mart. Kuntze populations in the Brazilian Atlantic Forest. *Ecology and Evolution*, **5(23)**: 5588-5600.

Uetz, P., Hošek, J. (Eds.) (2016): *Spilotes pullatus*, The Reptile Database. Available at www.reptile-database.org. Last accessed on 05 July 2016.

Vanzolini, P.E., Ramos-Costa, A.M.M., Vitt, L.J. (1980): Répteis das Caatingas. Rio de Janeiro. Academia Brasileira de Ciências.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Jequitibá-rosa individual (*Cariniana legalis*) where the two caninana snakes were recorded (*Spilotes pullatus*). Source: Pedro Santos (2015).



Figure 2: Climbing technique used in the study. A) Installation of ascending line. B) Climbing with single rope. Source: Pedro Santos (2015).



Figure 3: Viewing of the first caninana emerging from the tree hollowness during its biometrics. Source: Pedro Santos (2015).



Figure 4: Succession of undulations that allow the climbing of the serpent. Source: Pedro Santos (2015).



Figure 5: First snake moving on the 4th branch of the tree. Source: Pedro Santos (2015).



Figure 6: Second serpent observed at 31m high in the 4th branch of the tree. Source: Pedro Santos (2015).



Figure 7: Observation of the second serpent that stood still there and puffed its neck after eye contact with the first snake. Source: Pedro Santos (2015).



Figure 8: First snake returning to the hollowness from where it had left, after encountering with the second serpent. Source: Pedro Santos (2015).

ANEXO B – Autorização do SISBIO para coleta de material vegetal



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 50059-1	Data da Emissão: 10/07/2015 20:24
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

--	--

Nome: Pedro Miguel Domingues dos Santos **SISBIO** CPF: 054.934.517-51

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área pública ou privada onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços online - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
9	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPECIE	Canthiana legalis

Este documento (Comprovante de registro para coleta **SISBIO** de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 78287833



Página 1/1

ANEXO C – Análise de solo do jequitibá-rosa da Divisa Nova



RELATÓRIO DE ENSAIO DE SOLO

L09:Loja Alfenas
Av. Alberto Vieira Romão, 2690
Comp. 2684
37130000 - Alfenas - MG



Proprietário: Pedro Miguel Domingues dos Santos
Propriedade: RPPN Mata da Figueira

Data de emissão: 28/07/2015
Material Analisado: Solo.

PROTOCOLO		IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	
23004		Jequitibá Rosa - Divisa Nova; Prof.: não informada	
DETERMINAÇÕES		AMOSTRAS	
		23004	
pH	pH (CaCl ₂ 0,01 mol/L-1) -	5,3	
M.O.	Matéria Orgânica g/dm ³	64	
Carb.Total	Carbono Total g/dm ³	37	
P	Fósforo (Resina) mg/dm ³	23	
K	Potássio (NH ₄ Cl) mmol/dm ³	4,8	
Ca	Cálcio (NH ₄ Cl) mmol/dm ³	103	
Mg	Magnésio (NH ₄ Cl) mmol/dm ³	31	
H+Al	Hidrogênio + Alumínio mmol/dm ³	41	
Al	Alumínio (NH ₄ Cl) mmol/dm ³	0	
H	Hidrogênio mmol/dm ³	41	
S.B.	Soma de Bases mmol/dm ³	138,8	
C.T.C.	Cap. Troca Catiônica mmol/dm ³	179,8	
V%	Saturação de Bases %	77	
B	Boro (Água Quente) mg/dm ³	0,19	
Cu	Cobre (DTPA) mg/dm ³	2,3	
Fe	Ferro (DTPA) mg/dm ³	113	
Mn	Manganês (DTPA) mg/dm ³	51,5	
Zn	Zinco (DTPA) mg/dm ³	8,7	
K na CTC	% de Potássio na C.T.C. %	2,7	
Ca na CTC	% de Cálcio na C.T.C. %	57,3	
Mg na CTC	% de Magnésio na C.T.C. %	17,2	
Al na CTC	% de Alumínio na C.T.C. %	0	
H na CTC	% de Hidrogênio na C.T.C. %	22,8	
Ca/Mg	Relação Ca/Mg -	3,3	
Ca/K	Relação Ca/K -	21,5	
Mg/K	Relação Mg/K -	6,5	

Responsável: . Cesar Aparecido Alves
CRQ 2ª Reg. 02100851

Assinatura

COOPERATIVA REGIONAL DE CAFEICULTORES EM GUAXUPÉ LTDA. - COOXUPÉ

Rua Manoel Joaquim Magalhães Gomes, 440 - Guaxupé - Minas Gerais - CEP: 37800-000 - Fone 35 3696 1205 - Fax 35 3696 1206 - Site: www.cooxupe.com.br