

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Otimização da produção de mudas clonais de eucalipto com o  
uso de bioestimulantes**

**Gabriela Ferraz Leone**

Tese apresentada para obtenção do  
título de Doutora em Ciências. Área de  
concentração: Fisiologia e Bioquímica  
de Plantas

**Piracicaba  
2019**

**Gabriela Ferraz Leone**  
**Bióloga**

**Otimização da produção de mudas clonais de eucalipto com o uso de  
bioestimulantes**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Tese apresentada para obtenção do  
título de Doutora em Ciências. Área  
de concentração: Fisiologia e  
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba**  
**2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Leone, Gabriela Ferraz

Otimização da produção de mudas clonais de eucalipto com o uso de bioestimulantes  
/ Gabriela Ferraz Leone. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.  
-- Piracicaba, 2019.

143 p.

Tese (Doutorado) -- USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Eucalyptus* spp. 2. Ácido tânico 3. Extrato de alga 4. Rizogênese I. Título

À toda minha família e  
amigos,

*Dedico*

*Ofereço*

À todos os meus mestres,  
desde a infância até os dias de hoje!

*“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade.  
Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível”*  
(Charles Chaplin)

*“Tenham coragem, não tenham medo de sonhar coisas grandes”*  
(Papa Francisco)

## AGRADECIMENTOS

Desafio grande quanto escrever esta tese é o de agradecer em poucas palavras a todos que me auxiliaram no percurso da realização deste grande sonho;

Desta forma, agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido tantas graças ao longo da vida, por sempre ser meu refúgio nos momentos de angústia e especialmente pelas pessoas que colocou em meu caminho;

Agradeço ao orientador e amigo, Prof. Dr. Marcílio de Almeida por todos esses anos de orientação, pela confiança, paciência, compreensão e por ser este grande exemplo de profissional;

À Dra. Cristina Vieira de Almeida, mãe científica e amiga, pelo carinho de sempre. Agradeço imensamente pela confiança, ensinamentos e por seu contagiante entusiasmo pela ciência;

Aos Professores Fernando Dini Andreote e Fernando Angelo Piotto, por todo o suporte intelectual concedido;

À Maria Solizete Granziol Silva, secretária da pós-graduação, pela atenção e carinho que sempre me prestou;

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/ USP) e ao PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela oportunidade concedida e aos professores do programa pela contribuição na minha formação;

À *InVitroPalm* por todo o auxílio científico prestado;

Ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) pelo apoio prestado, principalmente ao Tiago de Freitas Davel, pela gentileza e prontidão que sempre me atendeu;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida ao longo do curso;

À Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP) por contribuir com a minha formação e por ter colocado em minha vida amigos que sempre levarei em meu coração;

À querida 'Família Morfogênese' (Rafinha, Eveline, Aline, Érika, Lena, Matheus, Renan, Rodrigo, Kéxa, Eloísa, Guilherme, Gabriel, Dreyphus, Lígia, Oliva e Nathan) por toda ajuda prestada ao longo destes anos; pelos cafezinhos, que sempre tornam os nossos dias mais leves e por todos os momentos inesquecíveis. Agradeço também aos que já passaram pelo laboratório e, que mesmo distantes continuam fazendo parte desta grande 'Família' (Liloca, Chico, Kathy, Leandro, Germana, Fabi, Nat, Marília e Raquel);

À minha maior cúmplice, minha mãe Elisete, pelo amor de sempre, por sua força avassaladora e por ter embarcado comigo neste sonho;

Ao meu pai João Mario por sempre acreditar em mim e me incentivar;

Ao Rafa, meu grande amigo, agradeço por ser esse irmão tão cuidadoso e presente;

Aos meus avós Lúcia, Joaquim, Clara e Ézio (*in memoriam*) por desde cedo terem me mostrado o verdadeiro sentido da palavra 'família';

Aos Almeida que sempre me trataram com muito amor e carinho, muito obrigada por terem se tornado a minha família científica e do coração;

Aos meus amigos de infância, que mesmo após tantos anos ainda são e sempre serão os meus '*magic beans*';

Ao Guilherme, pessoa especial que surgiu em minha vida e que vem me proporcionando tanta felicidade. Agradeço pelo constante incentivo, companheirismo, amor e amizade;

E por fim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

*"A gratidão é único tesouro dos humildes"*  
(William Shakespeare)

## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
REFERÊNCIAS.....	23
2 REVISÃO ENRAIZAMENTO.....	29
2.1 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES.....	29
2.2 ENRAIZAMENTO ADVENTÍCIO.....	30
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO RADICULAR.....	32
2.4 AUXINA NO ENRAIZAMENTO.....	34
2.5 NUTRIENTES.....	36
2.6 FATORES ABIÓTICOS.....	38
2.7 MICRORGANISMOS.....	40
2.8 BIOESTIMULANTES.....	45
REFERÊNCIAS.....	47
3 APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTES NO PROCESSO DE ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE EUCALIPTO.....	57
Resumo.....	57
Abstract.....	57
3.1 Introdução.....	58
3.2 Material e métodos.....	59
3.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	59
3.2.2 PREPARO DAS MINIESTACAS.....	60
3.2.3 TESTES PRELIMINARES.....	61

3.2.4	TRATAMENTOS.....	61
3.2.5	AVALIAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO DAS MINIESTACAS.....	62
3.2.6	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	63
3.2.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETA DOS DADOS.....	64
3.3	Resultados.....	64
3.3.1	TESTES PRELIMINARES E TRATAMENTOS.....	64
3.3.2	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DAS MINIESTACAS NOS TRATAMENTOS.....	65
3.3.3	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	73
3.4	DISCUSSÃO.....	75
3.5	Conclusões.....	84
	REFERÊNCIAS.....	84
4	ACLIMATIZAÇÃO DE MICROESTACAS DE <i>Eucalyptus urograndis</i> ALONGADAS <i>IN VITRO</i> COM BIOESTIMULANTES.....	89
	Resumo.....	89
	Abstract.....	89
4.1	Introdução.....	90
4.2	Material e métodos.....	92
4.2.1	LOCALIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL.....	92
4.2.2	MATERIAL VEGETAL.....	92
4.2.2.1	Introdução <i>in vitro</i> .....	93
4.2.2.2	Multiplificação <i>in vitro</i> .....	94
4.2.2.3	Alongamento <i>in vitro</i> .....	94
4.2.2.3.1	Testes preliminares.....	94
4.2.2.3.2	TRATAMENTOS.....	95
4.2.2.3.3	Microestacas <i>ex vitro</i> .....	96

4.2.3	Parâmetros analisados.....	98
4.2.4	Análises histológicas.....	99
4.2.5	Delineamento experimental e coleta dos dados.....	99
4.3	Resultados.....	101
4.3.1	TESTES PRELIMINARES E TRATAMENTOS.....	101
4.3.2.	MICROESTACAS <i>EX VITRO</i> .....	103
4.3.3	ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	107
4.4	Discussão .....	107
4.5	CONCLUSÕES.....	112
	REFERÊNCIAS.....	112
5	BIOESTIMULANTES NA ACLIMATIZAÇÃO DE MICROESTACAS DE <i>Eucalyptus urophylla</i> .....	117
	Resumo.....	117
	Abstract .....	117
5.1	Introdução.....	118
5.2	Material e métodos .....	120
5.2.1	LOCALIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL.....	120
5.2.2	CONSTITUIÇÃO DO MINIJARDIM CLONAL PARA OBTENÇÃO DE EXPLANTES .....	120
5.2.3	ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS BROTAÇÕES .....	121
5.2.4	ACLIMATIZAÇÃO DAS MICROESTACAS .....	122
5.2.5	PARÂMETROS ANALISADOS.....	125
5.2.6	ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	126
5.2.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETA DOS DADOS .....	126
5.3	Resultados.....	127
5.3.1	ACLIMATIZAÇÃO DE BROTAÇÕES DE <i>EUCALYPTUS</i> SPP COM BIOESTIMULANTES... 127	

5.3.2	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	131
5.4	DISCUSSÃO.....	132
5.5	CONCLUSÕES .....	138
	REFERÊNCIAS.....	138
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143

## RESUMO

### Otimização da produção de mudas clonais de eucalipto com o uso de bioestimulantes

Devido à grande importância que o gênero *Eucalyptus* apresenta, cada vez mais estudos relacionados à otimização da propagação de espécies do gênero vêm sendo conduzidos. Os principais entraves estão relacionados à sua clonagem e a recalcitrância que algumas espécies apresentam ao enraizamento e, por essa razão, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de bioestimulantes na mini e microestaquia de *Eucalyptus* spp. O presente trabalho se preocupou com o desenvolvimento de protocolos que não alteram excessivamente a prática empregada pelas empresas silviculturais. Para tanto, o trabalho foi dividido em 4 partes, sendo a primeira composta por uma revisão sobre enraizamento (item 2), visando elucidar todos os principais fatores que podem influenciar neste evento morfogênico. A partir desta revisão, se iniciaram estudos práticos com espécies e híbridos do gênero. O primeiro estudo (item 3) baseou-se na avaliação da morfofisiologia de miniestacas de três espécies de eucalipto (*E. urograndis*, *E. benthamii* e *E. urophylla*) em contato com AIB em pó e subsequente aplicação de tratamentos com bioestimulantes (ácido tânico e Algaren BZn<sup>®</sup>) utilizados de forma isolada e/ou em associação diretamente na base das miniestacas. O segundo estudo (item 4) avaliou a atuação destes mesmos tratamentos com bioestimulantes, em microcepas de *Eucalyptus urograndis* em fase de alongamento *in vitro* das brotações e sua posterior aclimatização. Por fim, o terceiro estudo (item 5) foi baseado na utilização dos tratamentos com bioestimulantes em microestacas de *E. urophylla* em fase de aclimatização em miniestufas, sendo os bioestimulantes aplicados na base das microestacas e na base das miniestufas (diretamente na bandeja). Em todos os experimentos foram coletados dados referentes aos parâmetros morfofisiológicos e, observou-se no primeiro e segundo experimento, que o ácido tânico na concentração de 250mg/L, foi o melhor tratamento empregado. Já, para o terceiro experimento, o Algaren BZn<sup>®</sup> na concentração de 1ml/L, apresentou resultados mais favoráveis. De acordo com as análises histológicas da rizogênese para todos os experimentos, verificou-se que as raízes adventícias desenvolvidas apresentaram origem cambial e conexão direta com o sistema vascular da parte aérea, indicando serem funcionais. O que permitiu constatar que, de forma geral, a adição de bioestimulantes otimizou a produção de mudas clonais de *Eucalyptus*.

Palavras-chave: *Eucalyptus* spp.; Ácido tânico; Extrato de alga; Rizogênese

## ABSTRACT

### **The optimization to producing eucalyptus clones with biostimulants**

According to the great importance that *Eucalyptus* genus presents, more studies are related to genus species propagation optimization have been conducted. Being the rooting recalcitrance that some species presents the main obstacle related to its cloning, this work had the aim to evaluate the biostimulants use in mini and microcuttings rooting process of *Eucalyptus* spp. For this, the present work was concerned with the protocols development that does not excessively alter the practice employed by silvicultural business. For this, the work was divided into 4 parts, the first have a rooting review (item 2), in order to elucidate all the main factors that may influence this morphogenic event. From this review, practical studies with species and hybrids of the genus were started. The first study (item 3) was based on the minicuttings morphology evaluation of the three eucalyptus species (*E. urograndis*, *E. benthamii* and *E. urophylla*) in contact with IBA in talc and the subsequent application of biostimulant treatments (tannic acid and Algaren BZn<sup>®</sup>) used in isolation and/or in combination directly on minicuttings base. The second study (item 4) evaluated the performance of these same treatments with biostimulants in *E. urograndis* microcuttings on the shoots elongation stage in vitro and their subsequent acclimatization. Finally, the third study (item 5) was based on the biostimulant treatments use in *E. urophylla* microcuttings in acclimatization phase in ministuff. The biostimulants were applied at microcuttings base and at ministuff base (directly on the trays). In all experiments, data regarding morphophysiological parameters were collected and it was observed in the first and second experiments that tannic acid at 250mg/L concentration was the best treatment used. For the third experiment, the Algaren BZn<sup>®</sup> in the concentration of 1 ml/L, presented more favorable results. According to the rhizogenesis histological analyzes for all the experiments, it was verified that the adventitious roots developed presented cambial origin and had a direct vascular connection with the aerial part, indicating its functionality. This showed that, in general, the biostimulants addition optimized the production of clonal *Eucalyptus* seedlings.

Keywords: *Eucalyptus* spp.; Tannic acid; Seaweed extract; Rhizogenesis

## 1 INTRODUÇÃO

Quando se pensa em floresta brasileira, a bacia Amazônica é a primeira que vem em mente, no entanto, a região não é o principal componente do setor florestal no Brasil. A silvicultura é amplamente aplicada no país, principalmente como indicadora de desenvolvimento econômico, referente à disponibilidade de energia, transporte, geração de empregos com mão-de-obra qualificada ou não, além de mercados de produtos florestais (McNabb 2004).

Dos 7,84 milhões de hectares de árvores plantadas no Brasil, 70% são compostas por eucalipto, pertencente à família Myrtaceae que apresenta cerca de 600 espécies e subespécies distribuídas essencialmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (IBÁ 2017; Ferraz Filho et al. 2018), sendo também cultivadas em menores proporções, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Tocantins, PiauÍ, Pará e Maranhão (IBÁ 2017) e sua plasticidade lhe confere excepcional dispersão mundial.

O cultivo do eucalipto para fins comerciais tem grande destaque no cenário econômico, por ser o biocombustível sólido mais utilizado e com maior potencial de crescimento em função da qualidade da madeira com sustentabilidade.

De acordo com Teixeira et al. (2009) seu uso minimiza o desmatamento e o extrativismo de espécies nativas utilizadas por muitas décadas, como fornecedoras de produtos de madeira sólida. Seu cultivo resulta também na fabricação de papel e celulose, essências florestais, além de sua efetiva aplicação na indústria moveleira e construção civil. A demanda de seus produtos no mercado é muito grande, despertando investimentos em pesquisas voltadas à maximização do cultivo, cujo principal objetivo é o desenvolvimento de clones adaptados aos mais diferentes ambientes.

Introduzido no Brasil no início do século XIX, o eucalipto, originário da Austrália e ilhas próximas, teve seu primeiro plantio no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, em 1825. No entanto, as pesquisas realizadas com o gênero tiveram início

somente no princípio do século XX quando Edmundo Navarro de Andrade implantou diversos hortos florestais da Companhia Paulista de Estradas de Ferro por todo o Estado de São Paulo, sendo o de Rio Claro o mais conhecido até os dias atuais (Pereira et al. 2000). Rapidamente, despertou-se o interesse comercial, tendo em vista que as espécies do gênero apresentam rápido crescimento, podendo ser cultivadas em diferentes solos, climas e altitudes, além da eventual resistência ao fogo e variações edafoclimáticas (Zanuncio et al. 1998; Campoe et al. 2012; Bui et al. 2016; Nakhooda; Jain 2016).

No Brasil, o gênero *Eucalyptus* se apresenta como uma importante matriz do agronegócio. A Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ), associação responsável pela representação institucional da cadeia produtiva de árvores plantadas, do campo à indústria, reúne empresas e associações estaduais do setor e seus diversos segmentos de atuação, sendo que, de acordo com seu relatório do ano-base de 2017, existem 50 empresas produtoras vinculadas e cadastradas; 9 associações estaduais distribuídas ao longo do território brasileiro e 5 empresas colaboradoras (IBÁ 2017).

Quando se trata de pesquisas com o tema “eucalipto” por todo o mundo, encontram-se mais de 20 mil publicações na base de dados web of Science, sendo que deste total, apenas 13 são de 1904 a 1919, período em que as pesquisas com o gênero foram iniciadas no Brasil; no período de 1920 a 1950, 68 pesquisas foram publicadas. Um volume maior de publicações ocorreu nos anos de 1960, representando 119 artigos publicados apenas nesta década. No período das décadas de 1970 a 1990, houve um total de 4.231 publicações. E, a partir de 2000 até o ano atual, já foram publicados 17.670 artigos sobre o tema. Sendo que deste total, 1.257 artigos científicos foram publicados em língua portuguesa, tendo em vista que grande parte dos pesquisadores brasileiros não publica em sua língua-mãe, este é um número bem consistente para demonstrar o quanto o tema é envolvido em pesquisas no país.

Enfatizando sua importância, a maior empresa produtora de papel e celulose do mundo, foi fundada no Brasil há 94 anos por Leon Feffer, a Suzano Papel e Celulose, que hoje está nas mãos da terceira geração da família, contando atualmente com a

colaboração direta de 8.066 profissionais, além da parceria com 11.108 terceirizados, contribuindo para a geração de empregos indiretos pela dinamização das atividades econômicas nas regiões de atuação (Plano de Manejo Florestal 2016). Não obstante, no ano de 2018, a empresa se uniu à sua maior concorrente, a Fibria, criando uma gigante do setor, com produção total de 11 milhões de toneladas e, tornando-se a quinta maior companhia em valor de mercado brasileiro, ficando atrás apenas da Petrobrás, Ambev, Vale e Telefônica (Scaramuzzo 2018).

No entanto, apesar de todas as vantagens que o gênero *Eucalyptus* apresenta, algumas dificuldades pontuais contribuem para a queda da produção, com destaque ao acometimento de insetos, pertencentes às ordens: lepidóptera, coleóptera e principalmente, himenóptera, que agrupa as formigas cortadeiras consideradas as principais pragas que atacam as florestas plantadas de forma intensa em todas as épocas do ano, e em qualquer fase de seu desenvolvimento, cujo ataque pode acarretar na desfolha total, resultando, inúmeras vezes, na morte da planta (Matrangolo et al. 2010). O problema referente à presença de formigas no cultivo do eucalipto, é tão sério que Marinho et. al (2002) relataram que existe maior biodiversidade de espécies de formigas em plantios de eucalipto, do que em áreas de matas nativas.

Outro problema bastante comum enfrentado na produção de eucaliptos é o ataque de patógenos, principalmente fungos, observados desde a fase de viveiro até os plantios adultos nos mais variados locais, espécies e épocas do ano. Dentre eles são destacados: *Oidium* sp., *Cylindrocladium candelabrum* Viégas, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* (responsáveis pelo tombamento de mudas) e *Cryphonectria cubensis* (causador do cancro), além da *Ralstonia solanacearum* (responsável pela murcha-bacteriana) (Santos; Auer; Grigoletti Jr 2001; Souza et al. 2010; Mafia et al. 2012).

Tanto no Brasil como em todo o mundo, florestas plantadas e nativas estão sujeitas a incêndios, responsáveis pelos maiores danos florestais, gerando perdas ambientais, econômicas, sociais e humanas (Santos; Soares; Batista 2006; Parizotto et

al. 2008). Para controlar esse infortúnio, o uso de retardante do fogo é uma alternativa viável que evita grandes perdas, sendo esta, uma estratégia eficaz aplicada por inúmeros produtores (Canzian et al. 2016).

Ainda relatando as dificuldades de cultivo do eucalipto e demais florestas plantadas, ressaltamos as geadas constantemente enfrentadas, tanto no sul do Brasil, como em outras regiões frias do mundo, tornando-se um fator limitante para a produção, pois se as plantas forem expostas por um período de cinco dias ao frio intenso, poderão sofrer danos severos, como queda das folhas, necrose do ponteiro apical ou até morte da planta. As plantas que apresentam resistência a geadas exibem mecanismos de prevenção e tolerância, em condições de temperaturas abaixo de 0°C, o metabolismo celular é afetado, reduzindo ao mínimo as funções fisiológicas mais importantes (Higa et al. 2000). Além disso, a falta de opções de espécies de *Eucalyptus* que sejam tolerantes a este evento da natureza, acarreta em limitações da expansão do cultivo do gênero no Sul do Brasil, sendo as espécies *E. benthamii* e *E. dunnii* alternativas potenciais para o empreendedor florestal nesses casos (Brondani et al. 2009).

Outro exemplo de fatores adversos aos quais os eucaliptos podem ser submetidos, são secas severas que, de acordo com Valdés et al. (2013), quando as árvores percebem o déficit hídrico ativam múltiplas respostas para sincronizar seu desenvolvimento e suas atividades moleculares, visando garantir sua sobrevivência (Santos; Schumacher 2016).

O processo de implantação de florestas de eucalipto se inicia com a propagação de mudas e, a qualidade e sanidade destas são fundamentais para o sucesso e desenvolvimento de indivíduos com alta produtividade. Como se não bastassem os problemas abordados, nos deparamos, nesta fase, com um gargalo no cultivo do gênero que, apesar de sua ampla plasticidade, muitas espécies, ou clones, apresentam diferentes formas de desenvolvimento, necessidades nutricionais específicas, seletividade quanto à aeração do substrato, disponibilidade de água e distintos manejos (Higashi; Silveira; Gonçalves 2000).

A produção de mudas de eucalipto é realizada essencialmente via reprodução sexuada ou seminal, gerando indivíduos com acentuada variabilidade genética. A produção pode se dar também por propagação clonal resultando em propágulos vindos da planta matriz. Este último método conserva o mesmo material genético da planta original, razão pela qual os novos indivíduos são designados *clones* (Almeida 2012; Baccarin 2012), mesmo que se considere as constantes variações epigenéticas (Higashi; Silveira; Gonçalves 2000).

A obtenção de mudas via propagação clonal oferece vantagens significativas, ponderando que é possível multiplicar maciçamente genótipos superiores previamente selecionados de populações naturais oferecendo maior eficiência no manejo florestal, além de melhor utilização do produto final (Hartmann et al. 2002; de Almeida et al. 2015). Com esse objetivo e visando maximizar a produção de mudas, de acordo com interesses economicamente específicos, matrizes são selecionadas para programas clássicos de melhoramento, auxiliando assim, na garantia da superioridade e homogeneidade das plantas (Baccarin 2012).

Dentre os métodos de obtenção de mudas aplicados na propagação do eucalipto, a estaquia é realizada a partir do enraizamento de estacas caulinares, sendo um dos métodos pioneiros de propagação clonal. No entanto, muitas vezes o uso desta técnica não é o mais indicado, pois, como descreve Brondani (2012), os problemas relacionados ao enraizamento são mais frequentes neste tipo de propagação clonal, observados principalmente em árvores adultas devido à alta produção de produtos considerados inibidores do enraizamento que, podem ser solucionados pelo uso de técnicas como mini e microestaquia.

A miniestaquia é similar à técnica de estaquia convencional, no entanto, algumas metodologias distintas permitem melhorar a qualidade da muda e seu respectivo enraizamento. Após a formação do minijardim clonal, composto de minicepas cujo ápice da brotação é podado emitindo novas brotações que poderão ser coletadas para utilização como miniestacas. No caso da microestaquia, utiliza-se microcepas oriundas de propagação *in vitro* que, por terem sido submetidas aos

processos de micropropagação, apresentam maior grau de juvenildade em comparação às minicepas (Xavier; Silva 2010). Em função disso, o *Eucalyptus* é o gênero florestal que mais possui estudos relacionados com a micropropagação (Dutra; Wendling; Brondani 2009), técnica *in vitro* que permite alta taxa de multiplicação, possibilitando clonagem de espécies e híbridos de alto valor e difícil enraizamento (Ratniekes; Assis 1993; Xavier; Silva 2010).

Dada a necessidade e importância das raízes para o desenvolvimento normal do propágulo, o enraizamento adventício consiste em um passo essencial para o sucesso destas técnicas, uma vez que, obviamente o propágulo necessita da existência deste órgão para continuar seu desenvolvimento, tendo em vista que as raízes podem ser induzidas artificialmente por vários métodos, no processo de propagação clonal, tais como estaquia convencional, miniestaquia e microestaquia.

Todavia, em qualquer um desses métodos de clonagem abordados, tanto para fins comerciais, como em programas de melhoramento genético, as dificuldades de enraizamento são enfrentadas, em função da recalcitrância às vias morfogênicas de rizogênese, ou seja, ampla dificuldade ao enraizamento, como reportado na década de 1990 por Assis (1997), onde o autor salientou que, a redução gradual do potencial de enraizamento do eucalipto pode estar envolvida com o envelhecimento ontogênico das matrizes selecionadas. Os autores de Almeida et al. (2017) reforçam as observações de Assis (1997) salientando que a propagação clonal de espécies lenhosas apresenta grande limitação em comparação com espécies herbáceas, por serem recalcitrantes à rizogênese.

A variação na capacidade de enraizamento existente, não somente entre as espécies, mas também, entre clones da mesma matriz de eucalipto, sendo então, um grande inconveniente no cultivo do gênero (Ferreira et al. 2004).

O enraizamento e a qualidade do sistema radicular garantem que a muda se desenvolva de maneira satisfatória até que seja levada ao campo. Entretanto, microestacas, ou seja, plantas que foram micropropagadas e aclimatizadas em situação *ex vitro*, acarretam alguns problemas de ordem prática e financeira,

considerando a expressiva fragilidade do sistema radicular do jovem clone, sendo a transferência da planta para as condições *ex vitro*, uma prática bastante lenta e conseqüentemente, onerosa. Essas observações se pautam em função da necessidade da total retirada do ágar que envolve o sistema radicular, pois além de injúrias que podem eventualmente ocorrer, o resto de ágar potencializará a contaminação do substrato, acarretando na perda da muda.

Uma das grandes limitações da micropropagação é o alto investimento em instalações e manutenção de um laboratório, resultando em aumento do custo de produção das mudas e também, na necessidade de desenvolvimento de protocolos específicos para diferentes espécies ou clones, bem como a recalcitrância de espécies lenhosas à propagação *in vitro* e seu posterior enraizamento *ex vitro* (Xavier; Otoni; Penchel 2007; Dutra; Wendling; Brondani 2009). Trabalhos como de Brondani et al. (2012); Baccarin et al. (2015) e Oliveira et al. (2015) mostram a importância e a necessidade do desenvolvimento destes protocolos para o sucesso na aclimatização *ex vitro*, bem como na produção de mudas de *Eucalyptus*.

O enraizamento adventício é a chave para a obtenção de sucesso nas técnicas de clonagem seja *in vivo* e/ou *in vitro* de espécies florestais, principalmente do gênero *Eucalyptus*. Considera-se que o processo de enraizamento pode ser dividido em três fases: indução, formação e expressão. A primeira relaciona-se a eventos bioquímicos e moleculares em células indiferenciadas, ao passo que a formação radicular é caracterizada por divisões celulares, organização dos primórdios radiculares e seu crescimento. Já, a fase de expressão é caracterizada pelo desenvolvimento dos primórdios radiculares e sua emergência (Li et al. 2009). Diferentemente das raízes típicas, que possuem origem embrionária, as raízes adventícias têm origem bastante diversificada, uma vez que se desenvolvem a partir de caules, folhas e outros órgãos da planta que não sejam a própria raiz e, portanto, podem ter origem em diferentes tipos celulares, de acordo com o tecido no qual elas são diferenciadas (Almeida; Almeida 2014; Bellini; Pacurar; Perrone 2014).

Estudos têm demonstrado que o enraizamento adventício, além de ser controlado por fatores genéticos, é fortemente influenciado por estímulos ambientais, dentre os quais se destacam a luz, temperatura, nutrição, auxinas e a interação com microrganismos, a qual vem sendo amplamente estudada, principalmente no que se refere à resistência vegetal a possíveis patógenos. Todas as plantas são hospedeiras de comunidades microbianas em sua superfície (microrganismos epifíticos) e no interior de órgãos, tecidos e células (endófitos e endosimbiontes) (Almeida et al. 2009; Guttman; McHardy; Schulze-Lefert 2014).

Andreote (2007) relatou que existem bactérias cujas associações são benéficas às plantas, incluindo desde os íntimos simbioses, como rizóbios, até as espécies saprofitas de vida livre, que proporcionam o aumento da disponibilidade de nutrientes, como também podem atuar suprimindo o desenvolvimento de potenciais fitopatógenos. O autor reforça ainda que, muitas destas bactérias podem produzir auxinas, etileno, citocininas, vitaminas e outras substâncias diretamente envolvidas com o desenvolvimento vegetal, podendo atuar positivamente sobre a produtividade no campo.

As plantas podem recrutar membros da comunidade microbiana do solo para *feedbacks* positivos, porém, os mecanismos e características do vegetal que guiarão a montagem e a função exercida pelo microbioma são, ainda em parte, desconhecidos (Pérez-Jaramillo; Mendes; Raaijmakers 2015).

No solo existem regiões que sofrem maior influência da atividade microbiana, como é o caso da rizosfera, definida por Hiltner (1904) como a região ao redor das raízes, geralmente com 1 a 3 mm, onde há crescimento bacteriano e pode variar de acordo com fatores relacionados ao solo, espécie vegetal e sua idade (Campbell; Greaves 1990). Cook et al. (1995) postularam que as plantas podem modular o microbioma da rizosfera em benefício próprio, estimulando seletivamente microrganismos que sejam favoráveis para seu crescimento e desenvolvimento. No entanto, a partir de 2007, Cardoso e Nogueira, estabeleceram a rizosfera como “a região do solo que recebe influência direta das raízes, possibilitando proliferação

microbiana”. Açúcares e aminoácidos são exsudados pelas plantas, formando um ambiente muito dinâmico e competitivo, tornando-se assim, propício ao desenvolvimento microbiano. Acrescenta-se ainda que, estes exsudados que determinam o tipo da comunidade microbiana na rizosfera, sugere-se que plantas diferentes tenham seleção de microrganismos da rizosfera distintas, responsáveis por suprir da melhor forma possível seu desenvolvimento, o que possivelmente ocorra devido à diferenciação existente entre exsudados radiculares para cada espécie, a interação existente entre bactérias e plantas hospedeiras, é, portanto, específica e complexa e, desta forma, os exsudados de raízes podem surgir resultando uma indução da expressão gênica bacteriana (Taghavi et al. 2010; Mendes et al, 2011; Lundberg et al. 2012). Considerando-se que esses exsudatos determinam o tipo da comunidade microbiana na rizosfera, pondera-se que plantas diferentes tenham seleção de microrganismos distintos, responsáveis por suprir, da melhor forma possível, seu desenvolvimento (Mendes et al. 2011), modificando fisiológica e bioquimicamente as células vegetais (Batagin-Piotto 2013).

Além da interação microbiana com a planta, podem atuar sobre o fenômeno morfogênico, os reguladores de crescimento vegetais, cujo papel é fundamental para a rizogênese podendo atuar de formas distintas de acordo com a espécie (Lakshmanan; Selvaraj; Bais 2014), sejam eles endógenos ou exógenos. Dentre os compostos endógenos que apresentam atividade auxínica e comercialmente disponíveis, destacam-se o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (AIB), os quais são amplamente utilizados na indução de raízes adventícias nos sistemas de propagação assexuada *in vivo* e/ou *in vitro* (Ludwig-Müller 2000; Marchioro 2005; Li et al. 2009). Sua aplicação proporciona maior porcentagem, velocidade, qualidade e uniformidade de enraizamento (Hartmann et al. 2002). Existem trabalhos que descrevem o uso destes reguladores de crescimento com substâncias como compostos fenólicos (Curir et al. 1990; Prado 2014), bem como a combinação dos micronutrientes zinco e boro, sendo que as funções mais conhecidas do zinco nas plantas são: participação na síntese do AIA (ácido indolacético) importante para o

RNA, pois inibe a RNase que hidrolisa o RNA; redução do nitrato a nitrito, oxidases e outras (Malavolta; Vitti; Oliveira 1997) e, na célula vegetal, o boro participa da divisão celular, aumento no tamanho das células, transporte de carboidratos da folha para outros órgãos (Malavolta 1980) e atua como agente morfogenético (Spurr 1957).

A importância de compostos fenólicos, oriundos do metabolismo secundário das plantas durante o processo de enraizamento foi constatada em trabalhos clássicos, como as pesquisas desenvolvidas por Bartolini; Tattini (1986) e Curir et al. (1990), os quais mostram que sua associação com auxinas, favorecem este evento morfogênico. A biossíntese dos compostos fenólicos ocorre a partir de diferentes rotas e, de acordo com Taiz; Zeiger (2009), esta é a razão pela qual este é um grupo tão heterogêneo metabolicamente. Os produtos fenólicos vêm sendo utilizados principalmente por sua ação antipatogênica além de atuar como reguladores de crescimento (Almeida 1999) e, quando aplicado em plântulas de *Eucalyptus grandis in vitro*, favoreceu o enraizamento e o sistema aéreo destas (Lima 1998).

Outros produtos utilizados visando à otimização do cultivo de espécies vegetais de interesse comercial, tais como feijão, soja, milho e trigo, são os extratos de algas, aplicados como fertilizantes e bioestimulantes. Os resultados obtidos com esses produtos demonstram melhoria na germinação, no estabelecimento da plântula além de aperfeiçoar o sistema radicular, refletindo no estabelecimento em campo e na produtividade vegetal (Carvalho; Castro 2014; Araújo 2016).

É importante reforçar que um sistema radicular adventício bem formado, exibindo uma arquitetura o mais próximo possível ao sistema radicular típico, é fundamental, porém, a funcionalidade desse sistema para que a planta formada apresente um bom desenvolvimento é essencial. Por exemplo, raízes que tem origem de calos (presença frequente em estacas de eucalipto) podem ocasionar no tombamento da muda pela fragilidade de fixação da planta ao solo, além de gerar um déficit de transporte orgânico e inorgânico por não ter uma conexão vascular direta das raízes adventícias com a base da estaca, portanto, é imprescindível que as raízes adventícias formadas, sejam provenientes do câmbio da base da estaca. Não

obstante, também é indispensável uma perfeita conexão vascular entre raiz adventícia e estaca, de maneira a permitir uma eficiente via xilemática e floemática entre os sistemas aéreo e radicular, garantindo o bom desenvolvimento da nova planta.

Em função de sua importância e visando a otimização da produção de clones de eucaliptos com genótipos superiores o objetivo deste trabalho foi determinar protocolos de enraizamento de mini e microestacas de *Eucalyptus*, por meio da aplicação de bioestimulantes, ácido tânico e Algaren BZn® (extrato da alga *Ecklonia máxima* suplementado com os micronutrientes Boro e Zinco). A escolha desses produtos foi pautada nos resultados obtidos em pesquisas realizadas com extratos de alga e a atividade do ácido tânico sobre o enraizamento de angico do cerrado, trabalhos realizados respectivamente, por (Carvalho; Castro 2014; Araújo 2016; Almeida 1999).

## REFERÊNCIAS

- Almeida CV (1999) Atuação do ácido tânico na nodulação e no desenvolvimento de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. - Mimosoideae. 1999. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 91p.
- Almeida CV, Andreote FD, Yara R, Tanaka FAO, Azevedo JL, Almeida M (2009) Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. *World J Microbiol Biotechnol.* 25:1757-1764
- Almeida LV (2012) Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 107p.
- Almeida M, Almeida CV (2014) Morfologia da raiz de plantas com sementes. Piracicaba: ESALQ/USP, 71p. Disponível em: <http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/44838>
- Andreote FD (2007) Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 203p.

- Araújo DK (2016) Extratos de *Ascophyllum nodosum* no tratamento de sementes de milho e soja: avaliações fisiológicas e moleculares. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 109p
- Assis TF (1997) Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *EUCALYPTUS*, Salvador, 1997. Anais... Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1:300-304
- Baccarin FJB (2012) Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 78p
- Baccarin, FJB, Brondani GE, Almeida LV, Vieira IG, Oliveira LS, Almeida M (2015) Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. New For. 46(4):465-483
- Bartolini G, Tattini M (1986) Effects of phenolic acids and auxin on rooting *Olea europaea* L. cuttings. Hortscienc. 21:2-262
- Batagin-Piotto, KD (2013) Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 165p
- Bellini C, Pacurar DI, Perrone I (2014) Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. Annu. Rev. Plant Biol. 65:639-666
- Brondani GE, Dutra LF, Grossi F, Wendling I, Hornig J (2009) Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. R. Árvore. 33(1):11-19
- Brondani GE (2012) Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 184p.
- Brondani GE, Baccarin FJB, Ondas HWW, Stape JL, Gonçalves NA, Almeida M (2012) Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. J For.Resear. 23(4):583–592
- Bui EN, Thornhill AH, González-Orozco CE, Knerr N, Miller JT (2016) Climate and geochemistry as drivers of eucalypt diversification in Australia. Geobiology. 15:427–440
- Campbell R, Greaves MP (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: Lynch JM. The Rhizosphere. New York: John Wiley p.11-34
- Campoe OC, Stape JL, Laclau JP, Marsden C, Nouvellon Y (2012) Stand-level patterns of carbon fluxes and partitioning in a *Eucalyptus grandis* plantation across a gradient of productivity, in São Paulo State, Brazil. Tree Physiol. 32:696-706
- Canzian WP, Fiedler NC, Brinate IB, Juvanhol RS, Bighi KN (2016) Diferentes concentrações de retardante de fogo em plantios de eucalipto. Nativa. 4(4):195-198

- Cardoso EJBN, Nogueira MA (2007) A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas in Silveira APD, Freitas SS. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Instituto Agronômico de Campinas p.79-96
- Carvalho MEA, Castro PRC (2014) Extratos de algas e suas aplicações na agricultura. Série Produtor Rural - nº 56, 60p.
- Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Fujimoto D, Mazzola M, Bangera G, Kim DS (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Proc Natl Acad Sci USA. 92:4197–4201
- Curir P, Vansumere CF, Termini A, Barthe P, Marchesini A, Dolci M (1990) Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* hook micropropagated through axillary bud stimulation. Plant Physiol. 92:1148-1153,
- de Almeida MR, Bastiani D, Gaeta ML, Mariath JEA, Costa F, Retallick J, Nolan L, Tai HH, Strömvik MV, Fett-Neto AG (2015) Comparative transcriptional analysis provides new insights into the molecular basis of adventitious rooting recalcitrance in *Eucalyptus*. Pl. Scienc. 239:155–165
- de Almeida MR, Aumond Jr. M, Costa CT, Scwambach J, Ruedell CM, Correa LR, Fett-Neto AG (2017) Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings. Trees. 31:1377-1390
- Dutra LF, Wendling I, Brondani GE (2009) A micropropagação de eucalipto. Pesqui. Florest. Bras. 58:49-59.
- Ferraz Filho AC, Mola-Yudego B, González-Olabarria, JR, Scolforo JR (2018) Thinning regimes and initial spacing for *Eucalyptus* plantations in Brazil. An. Acad. Bras. Ciênc. 90(1): 255-265
- Ferreira EM, Alfenas AC, Mafia RG, Leite HG, Sartorio RC, Filho RMP (2004) Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. Rev Árv. 28:183-187
- Guttman DS, McHardy AC, Schulze-Lefert P (2014). Microbial genome-enabled insights into plant–microorganism interactions. Nature Rev 15:797-813
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (2002) Plant Propagation: Principles and Practices. 7th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 880p
- Higa RCV, Higa AR, Trevisan R, Souza MVR (2000) Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii* Maiden plantados em Campo Do Tenente, PR. Bol. Pesq. Fl. Colombo. 40:67-76
- Higashi EM, Silveira RLVA, Gonçalves NA (2000) Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Circular Técnica IPEF, Piracicaba, n.192, p.11.
- Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. Arb. Deut. Landwirtsch. Ges. 98:59-78
- IBÁ (2017) Indústria Brasileira de Árvores. Relatório IBÁ 2017, Brasília, 80p.

- Lakshmanan V, Selvaraj G, Bais HP (2014) Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Plant Physiol.* 166:689–700
- Li SW, Xue L, Xu S, Feng H, Na L (2009) Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Bot Rev.* 75:230-247
- Lima CCM (1998) Uso de aditivos e cofatores na capacidade de enraizamento de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro*. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP
- Ludwig-Müller J (2000) Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regul.* 32:219-230
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488:86-90
- Mafia RG, Alfenas AC, Penchel Filho RM, Ferreira MA, Alfenas RF (2012) Murcha-bacteriana: disseminação do patógeno e efeitos da doença sobre a clonagem do eucalipto. *Rev. Árv.* 36(4):593-602
- Malavolta E (1980) Elementos de nutrição mineral de plantas. Piracicaba: Agronômica Ceres, 251p.
- Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo, 319 p.
- Marchioro LET (2005) Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 74 p.
- Marinho CGS, Zanetti R, Delabie JHC, Schlindwein MN, Ramos LS (2002) Diversidade de formigas (Hymenoptera: Formicidae) da serapilheira em eucaliptais (Myrtaceae) e área de cerrado de Minas Gerais. *Ecology, Behavior and Bionomics.* 3(2):187-195
- Matrangolo CAR, Castro RVO, Della Lucia TMC, Della Lucia RM, Mendes AFN, Costa JMFN, Leite HG (2010) Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. *Pesq. Agropec. Brasil.* 45(9):952-957.
- McNabb K (2004) An introduction to plantation forestry in Brazil. In: Gonçalves JLM; Benedetti V. *Forest nutrition and fertilization*. 1a ed. Piracicaba: IPEF. Cap. 1, p 1-12
- Mendes R, Kruijt M, Bruijn I, Dekkers E, Van Der Voort M, Schneider JHM, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PAHM, Raaijmakers JM (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Scienc.* 332:1097-1100
- Nakhoda M, Jain SM (2016) A review of *Eucalyptus* Propagation and Conservation. *Propag Ornament Plants.* 16:101-119
- Oliveira LS, Calsavara R, Batagin-Piotto KD, Brondani GE, Gonçalves AN, Almeida M (2015) Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. *Austr. For.* 78(4):219-231

- Pérez-Jaramillo JE, Mendes R, Raaijmakers JM (2015) Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Mol Bio.* 1, p.1
- Prado, DZ (2014) Enraizamento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* pela ação de peróxido de hidrogênio, quercetina e ácido indolbutírico. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP, 113p.
- Parizotto W, Soares RV, Batista AC, Sousa NJ (2008) Controle dos incêndios florestais pelo corpo de bombeiros de Santa Catarina: Diagnóstico e sugestões para seu aprimoramento. *Floresta.* 38(4):651-662
- Pereira JCD, Sturion JA, Higa AR, Higa RCV, Shimizu JY (2000) Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Colombo: Embrapa Florestas. 113p. (Embrapa Florestas. Documentos, 38).
- Plano de Manejo Florestal - Unidade São Paulo, 2016 - Resumo Público - Suzano Papel e Celulose, 40 p.
- Ratniekes E, Assis TF (1993) O que há adiante da árvore? O papel. 54(1):41-48
- Santos AF, Auer CG, Grigoletti Jr A (2001) Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Circular Técnica EMBRAPA - Ministério da Agricultura e do Abastecimento 20 p.
- Santos JF, Soares RV, Batista AC (2006) Perfil dos incêndios florestais no Brasil em áreas protegidas no período de 1998 a 2002. *Floresta.* 36(1):93-100
- Santos KF, Schumacher MV (2016) Ecofisiologia e crescimento de *Eucalyptus* em condição de déficit hídrico. *ENFLO.* 4(2):33-44
- Scaramuzzo M (2018) Suzano compra Fibria e cria gigante global de celulose com valor de R\$ 84 bi. O Estado de São Paulo. Disponível em: <https://economia.estadao.com.br/noticias/geral,suzano-acerta-compra-do-controle-da-fibria,70002229549> - Acesso em: 24/09/2018.
- Souza SE, Sansigolo CA, Furtado EL, Jesus Jr WC, Rodrigo Rocha Oliveira RR (2010) Influência do cancro basal em *Eucalyptus grandis* nas propriedades da madeira e polpação kraft. *Sci. For.* 38(88):547-557
- Spurr AR (1957) The effect of boron on cell walls structure in celery. *American Journal of Botany*, 44:637-650
- Taiz L, Zeiger E (2009) *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 819 p.
- Taghavi S, Lelie DVD, Hoffman A, Zhang YB, Walla MD, Vangronsveld J, Newman L, Sébastien M (2010) Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet*. 6:1-15
- Teixeira TOB, Silva ML, Jacovine LAG, Valverde SR, Silva JC, Pires VAV (2009) A percepção sobre o uso da madeira de eucalipto pelos fabricantes do polo moveleiro de Ubá-MG. *Rev. Árv.* 33:969-975
- Valdés AE, Irar S, Majada JP, Rodríguez A, Fernández B, Pagès M (2013) Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): a research on plant morphology, physiology and proteomics. *J Proteomics.* 79:263-76.

- Xavier A, Otoni WC, Penchel RM (2007) Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) Biotecnologia florestal. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p.55-74.
- Xavier A, Silva RL (2010) Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. *Agronomia Costarricense*. 34:93-98
- Zanuncio JC, Mezzomo JA, Guedes RNC, Oliveira AC (1998) Influence of strips of native vegetation on Lepidoptera associated with *Eucalyptus cloeziana* in Brazil. *For. Ecol. Manag.* 108:85-90

## 2 REVISÃO ENRAIZAMENTO

### 2.1 Formação e desenvolvimento das raízes

As plantas evoluíram para se adaptarem aos mais distintos habitats e graças à plasticidade fenotípica que apresentam, são encontradas nos mais diversos ambientes, sejam estes, terrestres, aquáticos e aéreos (Ge et al. 2018). A conquista do meio terrestre exigiu das plantas o desenvolvimento de raízes com uma rede de vasos condutores capazes de estabelecer o contato entre o sistema subterrâneo e o sistema aéreo, raízes e copa, respectivamente. Portanto, há de se saber que todas as plantas vasculares são dotadas de raízes, estruturas fundamentais que, como ressaltam os autores Almeida e Almeida (2014), a distinção dos tipos de raízes é estabelecida de acordo com a sua origem embrionária (típica) e não embrionária (adventícia).

As raízes de origem embrionária são denominadas *raízes típicas*, cujo desenvolvimento se dá a partir do polo radicular embrionário, originando a radícula que formará a raiz primária, a qual, juntamente com suas ramificações (ou raízes secundárias) desenvolverá um sistema radicular pivotante nas Gimnospermas e Eudicotiledôneas. Já, em Monocotiledôneas, o sistema radicular é fasciculado, formado por raízes adventícias com origem não embrionária, a partir do caule, folhas ou qualquer outra parte do vegetal que não seja a raiz primária e suas ramificações (Appezato-da-Glória; Hayashi 2006; Almeida; Almeida 2014).

A formação de raízes adventícias faz parte do desenvolvimento vegetal e ocorre naturalmente em várias espécies, sendo importante não somente para a estruturação do sistema radicular fasciculado em Monocotiledôneas, mas também na reprodução assexuada de diversas espécies de plantas, como um fenômeno adaptativo a mudanças ambientais, tendo em vista que o propágulo necessita da existência deste órgão para continuar seu desenvolvimento separado e independente da planta matriz (Bellini; Pacurar; Perrone 2014; Pacurar et al. 2014), cuja formação

também pode ser induzida artificialmente por vários métodos, no processo de propagação clonal.

Em estacas, a formação destas raízes adventícias pode ser dividida em fases de acordo com seu estágio metabólico e fisiológico, sendo: 1) *Desdiferenciação*, na qual as células se tornam competentes a responder ao sinal rizogênico (auxina); 2) *Divisão celular* (ou fase de indução) e 3) *Primórdio radicular* originado a partir do caule (Villacorta-Martín et al. 2015).

## 2.2 Enraizamento Adventício

O enraizamento adventício ocorre em fases sucessivas e independentes, sendo que cada uma delas apresenta características e necessidades próprias, estabelecendo então, novas raízes (de Almeida et al. 2017). Em estacas, por tratar-se de um fragmento da planta matriz que originará novas plantas, seu enraizamento também é caracterizado como adventício e, pode ocorrer de duas formas, por organogênese direta de tecidos celulares diferenciados (como o câmbio vascular) ou a partir de diferenciação em tecidos do calo (Brondani et al. 2012), sendo portanto, suas raízes caracterizadas como adventícias, por terem se originado a partir de outra região vegetal que não foi a raiz primária ou suas ramificações (Almeida; Almeida 2014).

Este evento morfogênico em plantas é baseado nos princípios de regeneração, o qual ocorre à formação de novos órgãos a partir de tecidos sem o respectivo meristema pré-existente (De Klerk 2002), podendo ser oriundo de folhas, hipocótilos ou caules (Esau 1977). De acordo com Kevers et al. (1997), a formação de raízes adventícias é dividida em três fases, sendo elas: 1) *Indução e compreensão* dos primeiros eventos moleculares e bioquímicos, onde não ocorre mudança morfológica visível; 2) *Iniciação*, com ocorrência das primeiras divisões celulares e formação do meristema da raiz, com estabelecimento dos primórdios radiculares; e 3) *Expressão*, com crescimento, alongamento e emergência das raízes (de Almeida 2015).

A competência à indução de raízes adventícias confere às plantas vantagens na propagação clonal, principalmente em espécies que apresentam recalcitrância ao

desenvolvimento de raízes, como os gêneros de alto interesse econômico, *Eucalyptus* e *Pinus* (Hartmann et al. 2011).

Considera-se, portanto, que, a indução de raízes é um fator limitante à produção comercial de espécies geneticamente melhoradas e com crescimento lento. Técnicas de propagação clonal são extremamente interessantes para quebra da recalcitrância que as espécies florestais apresentam, por multiplicar genótipos superiores de interesse econômico, obtidos em programas de melhoramento ou selecionados de populações naturais sendo, portanto, o desenvolvimento de raízes adventícias um pré-requisito para o sucesso da propagação de plantas *in vivo* e/ou *in vitro*. Por meio da propagação *in vitro* (micropropagação), obtém-se o rejuvenescimento da planta através da formação de propágulos, resultantes da alta taxa de multiplicação que acelera os programas de clonagem, otimizando o enraizamento de inúmeras espécies florestais, onde se destacam os eucaliptos (Hartmann et al. 2002; De Klerk; Krieken; Jong 1999; Baccarin 2012; Costa et al. 2013).

Todavia, a formação de raízes em estacas, sejam mini ou micro (oriundas de material conduzido *in vivo* ou *in vitro*), apresentam vários problemas que afetam a conclusão do processo de obtenção de novas mudas, podendo ser acarretados por fatores genéticos e/ou ambientais. O fator genético irá determinar a morfologia e o sistema radicular, enquanto que os estímulos ambientais formam a arquitetura pela modificação do programa genético intrínseco. A existência deste nível adicional de regulação permite que as plantas exibam um alto nível de plasticidade, refletindo na sua forma, na distribuição tridimensional, no padrão de ramificação e na idade das raízes primárias e pós-embrionárias geradas (Osmont; Sibout; Hardtke 2007; Pacheco-Villalobos; Hardtke 2012). Os autores Assis; Fett-Neto; Alfenas (2004) afirmaram que a qualidade do sistema radicular é importante às plantas propagadas, pois tendo em vista que as raízes adventícias não penetram profundamente o solo como as raízes pivotantes, estas plantas estão mais sujeitas ao tombamento, considerado um dos principais entraves na propagação clonal de eucalipto.

Assim sendo, este evento fisiológico é de suma importância no que tange a propagação clonal de espécies lenhosas, sejam elas florestais; ornamentais ou até mesmo frutíferas e, grandes perdas podem ser associadas à recalcitrância ao enraizamento adventício, caracterizada pela sua não formação ou então, a formação de um sistema radicular de baixa qualidade (Villacorta-Martín et al. 2015). Sendo os reguladores de crescimento essenciais para o sucesso deste evento morfogênico, especificamente aqueles do grupo das auxinas e de cofatores do enraizamento, que estimulam e aceleram o enraizamento das estacas (Ferreira et al. 2009).

### **2.3 Fatores que influenciam o desenvolvimento radicular**

A atuação dos nutrientes no desenvolvimento de raízes deve-se principalmente ao fato de que elementos minerais, além de interagirem entre si, o fazem também com outros elementos do solo, sendo transportados pela água a partir de sua disponibilidade para as plantas e, sua falta pode levar à deficiência nutricional (Giehl; von Wirén 2014). Leone (2013) comprovou que quanto maior a disponibilidade e absorção de nutrientes, maior será o sucesso quanto à produção e vigor do vegetal. Portanto, o sistema radicular é totalmente dependente da disponibilidade de macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e micronutriente (boro, cobre, ferro, cloro, manganês, molibdênio e zinco), visto que se adapta, por meio da alteração do número, tamanho, ângulo e diâmetro das raízes, diante de qualquer alteração na concentração dos nutrientes visando melhorar sua absorção (Bellini; Pacurar; Perrone 2014).

Nesse contexto, o estado nutricional da planta matriz que será utilizada para a propagação clonal, seja esta feita *in vitro* ou *in vivo*, é de extrema importância para garantir o sucesso, tendo em vista que seu estado nutricional determinará a quantidade de carboidratos, auxinas e outros compostos metabólicos que são fundamentais à iniciação e velocidade com que o sistema radicular será formado (Higashi; Silveira; Gonçalves 2004; Cunha et al. 2009a).

Cada planta apresenta um genótipo e um padrão de desenvolvimento próprio e, os fatores externos podem influenciar na expressão gênica, conferindo às plantas a plasticidade requerida às diferentes condições de cultivo (Benková et al. 2003). Estudos têm demonstrado que o enraizamento adventício, além de ser controlado por fatores genéticos, é fortemente influenciado por estímulos ambientais, dentre os quais se destacam a luz, temperatura, nutrição mineral, bem como a auxina exógena (Bellini; Pacurar; Perrone 2014).

Adicionalmente, sabe-se que os carboidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e compostos fenólicos, em condições e proporções adequadas, contribuem ao enraizamento adventício de estacas oriundas da planta-matriz (provedora de brotações), as quais, obrigatoriamente devem apresentar bom estado fisiológico no momento da coleta das brotações, para garantir o sucesso do processo de estaquia (Hackett 1987; Ono; Rodrigues 1996; Norberto 1999). Portanto, no que diz respeito ao estaqueamento de espécies lenhosas e seu posterior enraizamento, deve-se levar em conta o estado nutricional da planta matriz, tendo em vista que este fator determinará a quantidade de carboidratos, auxinas e compostos metabólicos fundamentais para o surgimento e desenvolvimento das raízes. Assim, a composição mineral da planta é fundamental por ter alto controle no comportamento morfofisiológico (Cunha et al. 2009a).

O monitoramento do potencial morfogênico a este evento fisiológico é considerado uma ferramenta essencial para elucidar a atuação de diversos fatores endógenos e exógenos na rizogênese adventícia, bem como monitorar o status metabólico relacionado a este evento, quando associado a técnicas histoquímicas específicas. Cabe ressaltar que a morfogênese corresponde a um processo que integra divisão, crescimento e diferenciação celular, conduzindo a um nível de organização supracelular (Handro; Floh 1990). Em plantas, como descrito por Almeida et al. (2015), é durante este evento fisiológico que o vegetal assume sua forma específica durante seu desenvolvimento com relação à morfologia externa e interna, ligando todos os componentes em nível celular até a planta completa.

Este processo é controlado principalmente, pela rede de transcrição de sinais, pelo posicionamento das células-filhas e pelos reguladores de crescimento, com destaque às auxinas, citocininas e giberelinas (De Smet et al. 2009; Almeida et al. 2015), os quais promovem a determinação e diferenciação das células competentes à multipotência (sistema de vascularização), à pluripotência (gemas e/ou raízes adventícias – organogênese) ou à totipotência (embriões somáticos – embriogênese somática) (Almeida et al. 2012; 2015; Graner et al. 2014). Cabe salientar que, além de formar o sistema radicular, é necessário que este apresente raízes funcionais, para exercerem todas as funções vitais, além de conferir boa sustentação à planta, evitando dessa forma o tombamento após dois a três metros de altura.

## **2.4 Auxina no Enraizamento**

Os reguladores de crescimento vegetal exercem forte influência nos processos morfogênicos e de maneiras distintas de acordo com a espécie (Lakshmanan; Selvaraj; Bais 2014) e, dentre eles, os comumente utilizados nas práticas de propagação *in vivo* e *in vitro*, destacam-se as auxinas. Os estudos sobre enraizamento adventício tiveram grandes avanços a partir do ano de 1928, com a identificação do primeiro fitohormônio de ocorrência natural: ácido 3-indolacético (AIA), uma auxina. E, em 1934, foi reportada por Thimann e Went, como promotora da formação de raízes adventícias.

Atualmente, ainda é considerada crucial para esse fenômeno, por proporcionar maior porcentagem, velocidade, qualidade e uniformidade no enraizamento (Hartmann et al. 2002; Borges et al. 2011), visto que está diretamente relacionada à divisão e alongamento de células meristemáticas, à diferenciação da raiz primária e à mobilização de reservas nutricionais para o local do enraizamento (Davis; Haissig; Sankhla 1988). Dentre os compostos endógenos que apresentam atividade auxínica e comercialmente disponíveis, destacam-se o ácido indolacético (AIA) (Marchioro 2005) e o ácido indolbutírico (AIB), os quais são amplamente utilizados à indução de raízes adventícias nos sistemas de reprodução assexuada

(propagação) *in vivo* e *in vitro* (Ludwig-Müller 2000; Li et al. 2009). No entanto, por apresentarem elevado valor comercial, diversos compostos auxínicos sintéticos ou que apresentam atividade auxínica são utilizados com o mesmo propósito em substituição ao AIA e ao AIB.

Além de ser um fator fundamental na formação das raízes adventícias, as auxinas são produzidas em folhas jovens, frutos em desenvolvimento e sementes (Cohen; Bandurski 1982), mas principalmente no meristema apical caulinar e transportada de forma basípeta pelo transporte polar de auxina. A relação existente entre o transporte polar de auxina, o pico de auxina e a indução de raízes adventícias foi mostrada por Ahkami et al. (2013) com miniestacas de *Petunia*. O influxo de auxina às células é controlado por AUX1/LAX (de Almeida et al. 2015).

Como já citado, a auxina exerce função primordial na rizogênese, sendo muitas vezes determinante e, é amplamente relacionada aos genes que regulam este evento morfofisiológico. Os três principais genes envolvidos neste processo são: *SHORT-ROOT (SHR)*; *SCARECROW (SCR)* e *AINTEGUMENTA LIKE1 (AIL1)*, sendo que os genes *SHR* e *SCR* sofrem forte influência deste regulador de crescimento vegetal e têm como função a manutenção de células em estado meristemático ou mantê-las competentes à divisão, e *AIL1* se relaciona à formação do primórdio de raiz adventícia (de Almeida 2009; 2015).

Além disso, no que tange o enraizamento de estacas, não somente a expressão da auxina endógena e o balanço interno de fitorreguladores influenciam neste evento morfogênico, como também a relação auxina/citocinina, sendo que esta pode ser mais importante do que o papel individual de cada hormônio vegetal (Arezki et al. 2000; Borges et al. 2011).

Hartmann et al. (2011) enfatizaram que a síntese de auxina também é realizada por microrganismos e, Patten; Glick (2002) e Tsavkelova et al. (2006a; 2006b) destacam as bactérias endofíticas e epifíticas dos gêneros *Gluconacetobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Actinomyces* spp., *Agrobacterium* spp., *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp.,

*Curtobacterium* spp., *Herbaspirillum* spp., *Pantoea* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. e *Xanthomonas* spp., por apresentarem a capacidade de promover o crescimento vegetal, ressaltando portanto, a necessidade de estudos relacionados à interação existente entre a planta e a microbiota associada, visto que diversos processos morfogênicos do vegetal não estão somente relacionados à fisiologia da planta, mas também a sua microbiota endofítica, a qual pode modificar fisiológica e bioquimicamente as células vegetais (Batagin-Piotto 2013).

## 2.5 Nutrientes

As raízes apresentam ampla plasticidade a sinais e alterações edáficas, endógenas, além de estímulos ambientais, já o sistema radicular é amplamente moldado de acordo com o estímulo recebido, podendo ser afetado de acordo com alterações hídricas, disponibilidade nutricional e de oxigênio e até mesmo por patógenos e pragas (Kong et al. 2014; Shahzad; Amtmann 2017). A demanda nutricional é importante tanto na formação de raízes típicas, quanto adventícias, sendo que para esta, no caso da estaquia, a planta matriz deve apresentar bom estado nutricional e vigor, tendo em vista que isto determinará a quantidade de carboidratos, auxinas e outros compostos metabólicos fundamentais à formação radicular (Cunha et al. 2009b).

De acordo com Leone (2013) teores adequados de macro e micronutrientes, especialmente nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e boro, são essenciais ao desenvolvimento dos vegetais, com importante atuação na regulação morfogênica (Mengel; Kirkby 1987; Assis; Teixeira 1998; Ramage; Williams 2002).

Cunha et al. (2009b) citam que o nitrogênio é um nutriente muito importante para a iniciação radicular, principalmente por sua relação no metabolismo dos carboidratos, fonte de energia para que este evento morfogênico ocorra (Hartmann et al. 2002). As raízes podem absorver e assimilar nitrogênio de diversas maneiras, sendo a mais comum em suas formas inorgânicas, nitrato ( $\text{NO}_3$ ) e amônio ( $\text{NH}_4$ ). No

entanto, a captação deste mineral varia de espécie a espécie já que a assimilação pode ocorrer também na forma orgânica, aminoácidos e peptídeos. Sua concentração e distribuição são determinadas pela complexidade e heterogeneidade do solo (Robinson 1994; Forde; Clarkson 1999; Forde 2014).

O metabolismo vegetal é fortemente influenciado pelo nutriente fósforo, cujas propriedades químicas, juntamente com o ácido fosfórico, fortalecem o fosfato inorgânico, única forma assimilada pelas plantas, devido à baixa mobilidade do fósforo no solo (Abel 2017). Na deficiência de fósforo, a planta pode se adaptar com mudanças significativas no sistema radicular, alterando as ramificações, comprimento total, alongamento dos pelos radiculares e formação de raízes laterais (Bucio et al. 2002; Cunha et al. 2009b; Shahzad; Amtmann 2017), o que provavelmente se dá pela redução da atividade meristemática (Kong et al. 2014).

Já o nutriente potássio, está envolvido em muitos processos na fisiologia vegetal, tais como: manutenção do turgor celular, regulação da abertura e fechamento estomático, transporte e armazenamento de carboidratos e síntese de proteínas (Cunha et al. 2009b), características importantes para a fase de indução radicular. Quando há deficiência deste nutriente, a síntese da parede celular e a turgescência das células são comprometidas, além disso, acarreta na redução da absorção da água pela parte aérea via transpiração e pressão radicular, murchando as plantas com facilidade (Façanha; Canellas; Dobbss 2012).

O cálcio é um nutriente necessário para a divisão celular, formação da lamela média, alongamento da parede celular, exercendo um papel importante no crescimento e desenvolvimento das raízes, sejam elas adventícias ou não (Cunha et al. 2009b). De acordo com Sako et al. (2005) a deficiência do fornecimento de cálcio na ponta das raízes provoca a interrupção quase imediata do crescimento radicular.

O magnésio apresenta importância na síntese de DNA e RNA, na ativação de enzimas relacionadas à respiração e na fotossíntese, por ser um elemento constituinte da clorofila (Cunha et al. 2009b). Além disso, de acordo com Sati et al. (2018), o

magnésio desempenha um papel crucial no transporte ativo de íons de cálcio e potássio pelas membranas celulares.

Leone (2013) revela que o balanço existente entre os nutrientes nitrogênio, fósforo e cálcio é essencial para as plantas, sendo importante tanto para a morfogênese vegetal, como para o seu crescimento, e os íons potássio, magnésio e enxofre parecem cumprir papel de suporte (Ramage; Willians 2002).

Com relação aos micronutrientes, estes são extremamente essenciais ao desenvolvimento e crescimento vegetal. De forma distinta aos macronutrientes, são requeridos em baixas concentrações nos tecidos e órgãos. Agem como constituintes das paredes celulares (boro) e das membranas celulares (boro e zinco), como constituintes de enzimas (ferro, manganês, cobre e níquel), como ativadores de enzimas (manganês e zinco) e na fotossíntese (ferro, cobre, manganês e cloro), alongamento celular (manganês), atuação direta no metabolismo de nitrogênio (zinco) (Kirkby; Römheld 2007; Cunha et al. 2009b).

A mobilização dos nutrientes durante a iniciação radicular é diferente daquela que ocorre durante o crescimento e desenvolvimento radicular (Cunha et al. 2009b). Desta forma, é de extrema importância que em todas as fases do cultivo além de boa disponibilidade de água, as plantas recebam a quantidade ideal de nutrientes para seu correto desenvolvimento e subsequente enraizamento.

## **2.6 Fatores Abióticos**

O ciclo global da água é representado pela modificação da interceptação da chuva, infiltração de água, redistribuição da água do solo e recarga das águas subterrâneas, alterando o armazenamento de água e disponibilidade nos ecossistemas por transpiração, desta forma, as plantas representam um importantíssimo papel no ciclo (Dubbert; Werner 2018).

Sabe-se que a água foi o elemento essencial para o surgimento e evolução de organismos aeróbios, possibilitando a conquista do ambiente terrestre. No caso das

plantas, o que possibilitou e facilitou essa conquista, foram as raízes, que de acordo com os autores Almeida; Almeida (2014), com o desenvolvimento dos sistemas subterrâneos, estes tornaram-se responsáveis pela aquisição de água e sais minerais, além da fixação da planta no solo.

A absorção de água é realizada principalmente pelas raízes mais finas que se encontram em contato com maior volume de solo por unidade de volume de raiz e ocorre devido a um gradiente decrescente do potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) entre o meio externo e o xilema radicular. Este gradiente pode se alterar de acordo com a transpiração vegetal (Pimenta 2012).

Tendo em vista que a água é uma das substâncias mais importantes e é a base da vida no planeta, como não poderia deixar de ser, o estabelecimento da rizogênese é modulado pela água e no que se trata à propagação de plantas por estaquia, o sucesso do enraizamento adventício dependerá da manutenção de um balanço hídrico satisfatório nos tecidos vegetais (Porto; Bosqueti 2017).

O processo de desenvolvimento das raízes é complexo, sendo regulado por múltiplos fatores endógenos como já citados, e ambientais abióticos e bióticos, além da água, a luz, temperatura, disponibilidade de nutrientes, estrutura físico-químicas do substrato, pH, bem como a interação com microrganismos (Sorin et al. 2005; Geiss; Gutierrez; Bellini 2009; Li et al., 2009), os quais serão detalhados mais adiante.

Com relação ao substrato, é de suma importância que este tenha condições adequadas de aeração e boa drenagem, tanto para a formação das raízes típicas, quanto adventícias (Lima; Ohashi 2016). No caso da propagação, estas condições garantirão a sobrevivência da futura planta. Devido a sua aeração e boa retenção de umidade, a vermiculita é amplamente utilizada para este fim, podendo ser utilizada isolada ou em combinação a outros materiais (Hartmann et al. 2011).

Já em relação à temperatura, cada espécie requer uma faixa distinta na qual se obtém um ótimo enraizamento. Brondani et al. (2017) revelaram que os parâmetros que podem ser considerados são temperaturas médias, máximas e mínimas ao longo do dia em intervalos de tempo determinados. Este parâmetro abiótico é muito

importante principalmente no que se refere ao enraizamento adventício e na aclimatização de estacas obtidas *in vitro*.

Além de todos os fatores supracitados, a associação das plantas com microrganismos é um fator muito importante para o desenvolvimento vegetal. Essa interação existente entre plantas e microrganismos ocorre durante todos os estágios de desenvolvimento do vegetal (Ortíz-Castro et al. 2009). Sendo assim, os microrganismos apresentam ampla importância no desenvolvimento e estabelecimento da rizogênese.

## 2.7 Microrganismos

Vale ressaltar que os fatores supracitados influenciam não apenas no desenvolvimento da planta, mas também na microbiota do solo e endofítica. Tendo em vista a importância da interação existente entre plantas e microrganismos e, que comumente esta é classificada como *patogênica* (responsável por inúmeras doenças que ocorrem nos vegetais), *epifítica* (microrganismos que colonizam a superfície das plantas) ou *endofítica* (microrganismos que colonizam o interior dos vegetais, sem lhes causar problemas aparentes). No entanto, esta classificação deve ser considerada meramente didática, visto que, em função de alterações físicas, químicas ou até mesmo bióticas, um microrganismo, que até então poderia ser considerado epifítico, pode tornar-se patogênico, ou simplesmente penetrar na planta tornando-se endofítico que, por sua vez, poderá pelas mesmas razões, tornar-se patogênico (Azevedo 1998). Dessa forma, microrganismos endofíticos são classificados como aqueles que habitam o interior do vegetal em pelo menos uma fase do ciclo vital, podendo colonizar órgãos e tecidos nos espaços inter e intracelulares (Azevedo 1998; Azevedo; Araújo 2003; Strobel 2003; Almeida et al. 2009). Esses microrganismos podem ser comensais, não apresentando efeito direto sobre a planta e mutualísticos, interagindo no metabolismo e na fisiologia do vegetal, auxiliando no desenvolvimento do hospedeiro, com destaque à produção de reguladores de

crescimento (Araújo et al. 2001; Schulz; Boyle 2005; Tsavkelova et al. 2006a; Ryan et al. 2008). De acordo com Ferreira et al. (2008), as bactérias em associação com as plantas podem atuar como indicadoras de alguma alteração ambiental, visto que sua comunidade interage com o vegetal durante todo seu ciclo de desenvolvimento, respondendo à eventuais alterações bióticas e/ou abióticas.

As plantas podem auxiliar os microrganismos, fornecendo-lhes abrigo, proteção e moléculas necessárias ao seu desenvolvimento, enquanto que os microrganismos fornecem substâncias que regulam o desenvolvimento vegetal, de acordo com o tipo do microrganismo e com as condições nas quais se encontra (Ortíz-Castro et al. 2009). Portanto, os microrganismos podem, muitas vezes, ser benéficos ao crescimento, desenvolvimento e produtividade do vegetal. Além disso, podem estar envolvidos com a síntese de hormônios como auxina, etileno e ácido jasmônico, os quais representam classes adicionais de moléculas de sinalização que influenciam as interações benéficas entre planta e microrganismos (Galdiano Jr. et al. 2011; Sukumar et al. 2013). Embora os microrganismos presentes no solo sejam comumente classificados como patogênicos diversos estudos evidenciaram a importância destes no desenvolvimento vegetal. No trabalho de Khokhar et al. (2011), os autores demonstraram que as bactérias presentes no solo podem desempenhar um papel importante na inibição do desenvolvimento de patógenos. Adicionalmente, foram identificadas bactérias presentes no solo, promotoras do crescimento vegetal e capazes de sintetizar hormônios vegetais (Freitas 2007; Cardoso; Nogueira 2007), bem como se sabe que as plantas podem recrutar membros da comunidade microbiana do solo para *feedbacks* positivos, porém, os mecanismos e características do vegetal que orientarão a composição e a função exercida pelo microbioma são ainda, em parte, desconhecidos (Pérez-Jaramillo; Mendes; Raaijmakers 2015).

Andreote; Gumiere; Durrer (2014) revelam que o termo “microbioma” foi primeiramente utilizado por Lederberg e McCray (2001), como a comunidade ecológica de microrganismos comensais, simbiotes ou patogênicos que ocupam certo espaço no corpo humano. Mais recentemente vem sendo utilizado para definir

comunidades microbianas encontradas em hospedeiros ou em ambientes específicos, como é o caso do solo, fazendo referência aos genes dos microrganismos que os compõem, bem como, o conjunto de informações e funções destes (Boon et al. 2014; Ofek et al. 2014). Dentro desse ambiente, os microrganismos exercem papel fundamental, por atuarem na manutenção de ciclos biogeoquímicos, fornecendo nutrientes essenciais ao desenvolvimento vegetal (Andrade 2013).

A comunidade microbiana no solo é constituída por representantes dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (Lambais et al. 2005). Os fungos, que são pertencentes ao último domínio citado, interagem muitas vezes de forma benéfica com as raízes das plantas. Sendo as relações micorrízicas caracterizadas como uma associação simbiótica mutualística que ocorre entre fungos específicos do solo com a maioria das espécies de plantas terrestres (Smith; Read 2008; Santana 2018). Algumas espécies como os eucaliptos, podem formar dois tipos de micorrizas, a *arbuscular* e a *ectomicorriza* (Araújo et al. 2004). Micorrizas arbusculares formam com as raízes de plantas terrestres uma das associações mutualísticas mais comuns da natureza, exclusiva dos fungos Glomales. A planta fornece ao fungo cerca de 10% de seus fotossintatos produzidos e, em contrapartida, as hifas dos fungos agem como uma superfície extra de absorção para as plantas, principalmente em solos com baixos teores nutricionais. Assim, nutrientes de baixa mobilidade, como o fósforo, são incorporados pelas plantas (Araújo et al. 2004; Cardoso et al. 2010; Santana 2018). Já as micorrizas ectomicorrizas, de acordo com Santana (2018), são caracterizadas por estruturas externas compostas por hifas e rizomorfos no sistema radicular, essenciais para conexão do solo e posterior formação de corpos de frutificação das ectomicorrizas.

Outra associação benéfica muito conhecida é aquela com *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, bactérias Gram-negativas, aeróbicas não esporulantes (Celador-Lera et al. 2017), que são capazes de induzir a formação de nódulos fixadores de nitrogênio em leguminosas. Envolvendo um reconhecimento específico entre os dois integrantes desta associação, sendo que a invasão de células vegetais por bactérias

pode acarretar em muitas mudanças na estrutura bioquímica de ambos os organismos à medida que o nódulo se desenvolve cuja característica é o auxílio às plantas na fixação de nitrogênio (Appelbaum 2018).

Essa interação se inicia com a exsudação de compostos pelas plantas, tais como carboidratos, aminoácidos, compostos fenólicos e, por quimiotaxia, as bactérias são atraídas para essa região induzindo os genes da nodulação-*nod* e *no1*, coletivamente denominados genes *nod* do rizóbio (Peters; Frost; Long 1986; Mercante; Franco 2000). Tendo em vista que os teores de nitrogênio são limitados na matéria orgânica do solo e, em caso de monoculturas, podem se esgotar após alguns cultivos, assim, a nodulação pela chamada fixação biológica por *Rhizobium* e/ou *Bradyrhizobium* é de extrema importância para culturas como a soja, feijão e leguminosas arbóreas. Essas estruturas especializadas denominadas nódulos converte amônia em amônio que então é incorporado pela planta hospedeira em diversas formas de nitrogênio orgânico, tais como ureídos, aminoácidos e amidas (Hungria; Campo; Mendes 2001).

Há regiões no solo que sofrem maior influência da atividade microbiana, como é o caso da rizosfera, definida por Hiltner (1904) como a região ao redor das raízes, geralmente com 1 a 3 mm, onde há crescimento bacteriano e que pode variar segundo fatores relacionados ao solo, idade e espécie vegetal (Campbell; Greaves 1990). No entanto, a partir de 2007, Cardoso e Nogueira, estabeleceram a rizosfera como “a região do solo que recebe influência direta das raízes, possibilitando a proliferação microbiana”. A comunidade aí encontrada é distinta daquela presente no restante do solo, justamente por encontrar-se sob a influência direta dos exsudados das raízes, como uma maior disponibilização de nutrientes (Andreote; Gumiere; Durrer 2014). Nesta região, açúcares e aminoácidos são exsudados, tornando assim um ambiente propício ao desenvolvimento microbiano. Portanto, sabendo-se que este ambiente é alterado quimicamente e rico em fontes de carbono liberado pelos exsudados das raízes, a atividade microbiana na rizosfera é distinta daquela encontrada em solo não rizosférico. Esse processo é conhecido como rizodeposição e tem sido proposto como o maior mecanismo das plantas à

manutenção de sua microbiota (Cardoso; Nogueira 2007; Bulgarelli et al. 2015). Considerando-se que os exsudados das raízes determinam o tipo da comunidade microbiana na rizosfera, sugere-se que plantas diferentes tenham seleção de microrganismos da rizosfera distintas, responsáveis por favorecer o desenvolvimento vegetal, provavelmente devido aos exsudados radiculares serem específicos para cada espécie (Mendes et al. 2011; Lundberg et al. 2012).

Estudos têm demonstrado que as plantas são dependentes do microbioma rizosférico da mesma forma que o microbioma humano é essencial para a manutenção e desenvolvimento do organismo, sendo considerado como um produto da seleção natural, visto que os microrganismos que ali colonizam podem influenciar na rizogênese, morfologia e estrutura de raízes, por alterar a permeabilidade de células das raízes com consequente modificação do metabolismo radicular, por meio do estímulo ou indução à produção de exsudados, bem como alterando a disponibilidade de nutrientes às plantas (Rovira; Davey 1974; Cardoso; Nogueira 2007). Cabe salientar que, o estágio de desenvolvimento vegetal também afeta a composição e a quantidade de exsudados radiculares, particularmente de compostos fenólicos (Bolton Jr.; Fredrickson; Elliott 1992). Os compostos fenólicos exsudados não são tóxicos às plantas que os produzem, pois normalmente estão sob a forma de glicosídeos inativos, lixiviados pela chuva, hidrolisados e oxidados por bactérias presentes no solo (Almeida 1999).

Considerando que a indução da raiz é dependente da sinalização pela auxina endógena ou exógena (Cunha et al. 2009a), que diversos microrganismos sintetizam este hormônio, afetam seu transporte e recrutam microrganismos para a colonização da rizosfera, justifica-se o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à interação dos microrganismos rizosféricos com produtos que se relacionem com a auxina e à rizogênese, visando superar os entraves relacionados a recalcitrância a este evento morfogênico principalmente em espécies do gênero *Eucalyptus* no setor da silvicultura clonal.

Tendo em vista que os microrganismos interagem com as plantas em associações benéficas. O uso de produtos que estimulem a microbiota da rizosfera vem sendo cada vez mais utilizados.

## 2.8 Bioestimulantes

De acordo com Kauffman; Watschke; Kneivel (2007), os compostos integrantes de uma categoria descrita como bioestimulantes são definidos como materiais, não fertilizantes, que promovem o crescimento das plantas. Estão disponíveis em uma variedade de formulações e com ingredientes variados, mas são geralmente classificados em três grupos principais com base em sua fonte e conteúdo. Esses grupos incluem substâncias húmicas, produtos contendo hormônios e aminoácidos (Du Jardin 2015).

Neste contexto, a utilização de produtos naturais que auxiliem na rizogênese é de grande interesse, tanto no quesito econômico quanto por evitar a formação de quimeras, que podem ser desenvolvidas pelo uso desenfreado de hormônios vegetais.

Existem trabalhos como o de Aremu et al. 2015 que utilizam extrato de algas da espécie *Ecklonia maxima*, onde os autores citam que esses compostos podem influenciar de forma positiva na produtividade geral, bem como na qualidade das plantas e com suas respostas a diversos estresses bióticos e abióticos. Além disso, Chiminelli (2017) revelou que o produto comercial Algaren BZn<sup>®</sup>, um fertilizante composto pelo extrato desta alga acrescido de Boro e Zinco vem sendo utilizado por ser responsável no estímulo da produção de citocininas, e, conseqüentemente, pode estimular o enraizamento.

Os vegetais produzem e secretam diversos metabólitos na rizosfera, os chamados metabólitos primários: ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos e os metabólitos secundários, conhecidos como “produtos naturais das plantas”. Esses últimos apresentam forte impacto na rizosfera, por mediar sua interação com outras

plantas, animais e microrganismos. Dentre os metabólitos secundários conhecidos, destacam-se os compostos fenólicos, que intercedem nas mensagens químicas entre o vegetal e outros organismos, conforme evidenciaram estudos realizados em bactérias do gênero *Rhizobium*, as quais iniciam o processo de nodulação nas raízes (Zhang; Ruyter-Spira; Bouwmeester 2015).

A importância destes produtos do metabolismo secundário das plantas durante o processo de enraizamento foi constatada em trabalhos clássicos, como as pesquisas desenvolvidas por Bartolini; Tattini (1986) e Curir et al. (1990), os quais evidenciaram que a associação de auxinas com fenóis, favorecendo este evento morfogênico.

A presença de ácido tânico, um tanino condensado, quando em contato com as plantas, pode auxiliar o desenvolvimento de raízes, principalmente porque estes podem atuar inibindo a ação da AIA-oxidase (Pandey; Pathak 1981; Hammatt 1993; Gajewska; Skłodowska 2007), prevenindo a destruição das auxinas. Podem também inibir o transporte polar de auxina (acrópeto), incrementando os níveis endógenos desse hormônio vegetal, e, portanto, favorecendo o enraizamento (Peer; Murphy 2007; De Klerk et al. 2011; Zhang; Ruyter-Spira; Bouwmeester 2015). Além disso, cofatores específicos produzidos em folhas jovens e gemas são translocados à região de enraizamento, onde junto com as auxinas e polifenoloxidades, aumentam o complexo que estimula a iniciação radicular (Almeida 1999).

A atuação de compostos fenólicos já foi evidenciada na propagação vegetal, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em auxílio à rizogênese (Curir et al. 1990; Lima 1998). E na rizosfera, onde a presença dessas substâncias é resultante de exsudações das raízes e, em função disto, estão essencialmente envolvidos em diferentes níveis na endossimbiose radicular (Hernández et al. 2009; Abdel-Lateif; Bogusz; Hoher 2012).

A exsudação das raízes na rizosfera é fundamental para a sobrevivência de microrganismos nessa região, por conter íons, enzimas e moléculas orgânicas, como aminoácidos e carboidratos, além de metabólitos secundários (compostos fenólicos), que muitas vezes são oriundos da quimiotaxia existente nesta região, ou seja, reação

dos microrganismos a gradientes químicos das diversas substâncias exsudadas pelas plantas hospedeiras (Mercante; Goi; Franco 2002).

Os compostos fenólicos são frequentemente sintetizados em resposta vegetal aos estresses biótico ou abiótico (Nicholson; Hammerschmidt 1992) e são exsudados na rizosfera, entrando em contato com microrganismos do solo, o que é de extrema importância para o estabelecimento de interações com microrganismos simbióticos. A relação mutualística simbiótica mais elucidada neste aspecto é a existente entre *Rhizobium* e leguminosas, que é modulada pela quimiotaxia (Cheynier et al., 2013). Siqueira et al. (1991) e Almeida (1999), destacaram que tanto *Rhizobium* quanto *Bradyrhizobium* são atraídos por compostos fenólicos em geral, os quais são potenciais fontes de nutrientes e, também em concentrações mais baixas, por compostos que possivelmente não tenham valor nutricional, como os flavonoides, compostos pertencentes ao grande grupo dos compostos fenólicos.

## REFERÊNCIAS

- Abdel-Lateif K, Bogusz D, Hoher V (2012) The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbiosis with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *Plant Signaling & Behavior*. 7(6):636-641
- Abel S (2017) Phosphate scouting by root tips. *Current Opinion in Plant Biology*. 39:168-177
- Ahkami AH, Melzer M, Ghaffari MR, Pollmann S, Javid MG, Shahinnia F, Hajirezaei MR, Druege U (2013) Distribution of índole-3-acetic acid in *Petunia hybrid* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta* 238(3):499-517
- Almeida CV (1999) Atuação do ácido tânico na nodulação e no desenvolvimento de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. - Mimosoideae. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 91p.
- Almeida CV, Andreote FD, Yara R, Tanaka FAO, Azevedo JL, Almeida M (2009) Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1757-1764
- Almeida M, Almeida CV, Graner EM, Brondani GE, Abreu-Tarazi MF (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Report* 31:1495–1515

- Almeida M, Almeida CV (2014) Morfologia da raiz de plantas com sementes. Piracicaba: ESALQ/USP, 71p. Disponível em: <http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/44838>  
Acesso em: 01/06/2018.
- Almeida M, Graner EM, Brondani GE, Oliveira LS, Artioli FA, Almeida LV, Leone GF, Baccarin FJB, Antonelli PO, Cordeiro GM, Oberschelp GPJ, Batagin-Piotto KD (2015) Plant morphogenesis: theoretical bases. *Advances in Forestry Science* 2:13-22
- Andrade PAM (2013) A composição da comunidade bacteriana do solo como fator determinante na micorrização de cana-de-açúcar por *Glomus clarum*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 74p.
- Andreote FD, Gumiere T, Durrer A (2014) Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola* 71(6):528-539
- Appelbaum E. (2017) The Rhizobium/Bradyrhizobium-Legume Symbiosis. In: Gresshoff PM *Molecular Biology Of Symbiotic Nitrogen Fixation* CRC Press, 278p.
- Appezato-da-Glória B, Hayashi AH (2006) Raiz. In: Appezato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM. *Anatomia Vegetal*. 2ª ed. Viçosa: Ed. UFV. 438p.
- Araújo CVM, Alves LJ, Santos OM, Alves JM (2004) Micorriza arbuscular em plantações de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell no litoral norte da Bahia, Brasil. *Acta bot. bras.* 18(3): 513-520
- Araújo WL, Maccheroni W, Aguilar-Vildoso CI, Barroso PAV, Saridakis HO, Azevedo JL (2001) Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canad J Microbiol* 47:229-236
- Aremu AO, Masondo NA, Rengasamy KRR, Amoo SO, Gruz J, Bība O, Subrtova M, Pencik A, Novák O, Dolezal K, Van Staden J (2015) Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. *Planta*. 241:1313–1324
- Arezki O, Boxus P, Kevers C, Gaspar T (2000) Hormonal control of proliferation in meristematic agglomerates of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 36(5):398-401
- Assis TF, Teixeira SL (1998) Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH p. 261-296.
- Assis TF, Fett-Neto AG, Alfenas AC (2004) Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: *Plantation Forest Biotechnology for the 21th century*, eds. C. Walter and M. Carson, pp. 303-333.
- Azevedo JL (1998) Microrganismos endofíticos. In: Melo IS, Azevedo JL (Ed.). *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA, p.117-137.
- Azevedo JL, Araújo WL (2003) Genetically modified crops: environmental and human health concerns. *Mutation Research* 544:223-233.

- Baccarin FJB (2012) Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 78p.
- Bartolini G, Tattini M (1986) Effects of phenolic acids and auxin on rooting *Olea europaea* L. cuttings. Hortscience. 21:2-262
- Batagin-Piotto KD (2013) Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 165p.
- Bellini C, Pacurar DI, Perrone I (2014) Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences. Annu. Rev. Plant Biol. 65:639-666
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J. (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. Cell. 115:591-602
- Bolton Jr. H, Fredrickson JK, Elliott L (1992) Microbial ecology of the rhizosphere. Soil microbial Ecology, New York, 2th. Ed. p.27-63
- Boon E, Meehan CJ, Whidden C, Wong DHJ, Langille MGI, Beiko RG (2014) Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes. FEMS Microbiology Reviews 38:90-118
- Borges SR, Xavier A, Oliveira LS, Melo LA, Rosado AM (2011) Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. Revista Árvore 35:425-434
- Brondani GE, Baccarin FJB, Wit Ondas HW, Stape JL, Gonçalves AN, Almeida M (2012) Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. J Forest Res 23(4):583-592
- Brondani GE, Oliveira LS, Konzen ER, Silva ALL, Costa JL (2017) Mini-incubators improve the adventitious rooting performance of *Corymbia* and *Eucalyptus* microcuttings according to the environment in which they are conditioned. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 90(2):2409-2423
- Bucio JL, Hernández-Abreu EH, Calderón LS, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L (2002) Phosphate availability alter architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. Plant Physiol. 129:244-256
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, McHardy AC, Schulze-Lefert P (2015) Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. Cell Host & Microbe. 17:392-403
- Campbell R, Greaves MP (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: LYNCH, J.M. The Rhizosphere. New York: John Wiley. p. 11-34.
- Cardoso EJBN, Nogueira MA (2007) A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas. In: Silveira APD, Freitas SS. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Instituto Agronômico de Campinas. p.79-96.

- Cheyrier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S (2013) Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. 72:1-20
- Celador-Lera L, Menéndez E, Peix A, Igual JM, Velázquez E, Rivas R (2017) *Rhizobium zeae* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) roots. *Int J Syst Evol Microbiol*. 67:2306-2311
- Chiminelli LO (2017) Resultados em campo do Algaren. Disponível em: <<http://agroatacado.com.br/novidades/resultados-em-campo-do-algaren/>>. Acesso em: 26/07/2018.
- Cohen JD, Bandurski RS (1982) Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 33(1):403-430
- Costa CT, De Almeida MR, Ruedell CM, Michels C, Schwambach J, Maraschin FS, Fett-Neto AG (2013) When stress and development go hand in hand: Main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*. 4:133-19
- Cunha ACMCM, Paiva HN, Leite HG, Barros NF, Leite FP (2009a) Relações entre variáveis climáticas com produção e enraizamento de miniestacas de eucalipto. *Rev. Árv*. 33(2):195-203
- Cunha ACMCM, Paiva HN, Xavier A, Otoni WC (2009b) Papel da nutrição mineral na formação de raízes adventícias em plantas lenhosas. *Pesq. Flor. Brasil*. 58:35-47.
- Curir P, Vansumere CF, Termini A, Barthe P, Marchesini A, Dolci M (1990) Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiology*. 92:1148-1153
- Davis TD, Haissig BE, Sankhla N (1988) Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides Press.
- De Almeida MR (2009) Análise de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus globulus* Labill durante o processo de enraizamento adventício através da técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real. Monografia (Bacharel Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 43p.
- De Almeida MR (2015) Bases moleculares da recalcitrância ao enraizamento adventício em *Eucalyptus globulus* Labill. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 76p.
- De Almeida MR, Bastiani D, Gaeta ML, Mariath JEA, Costa F, Retallick J, Nolan L, Tai HH, Strömvik MV, Fett-Neto AG (2015) Comparative transcriptonal analysis provides new insights into the molecular basis of adventitious rooting recalcitrance in *Eucalyptus*. *Plant Scienc* 239:155-165
- De Almeida MR, Aumond Jr M, Da Costa CT, Schwambach J, Ruedell CM, Correa LR, Fett-Neto AG (2017) Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings. *Trees* 31:1377-1390
- De Klerk GJ, Van Der Krieken W, De Jong JC (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 35:189-199
- De Klerk GJ (2002) Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cell Dev Biol*. 38:415-422

- De Klerk GJ, Guan H, Huisman P, Marinova S (2011) Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus 'Jork 9'*. *Plant Growth Regul.* 63:175-185
- De Smet I, Voss U, Jürgens G, Beeckman T (2009) Receptor-like kinases shape the plant. *Nature Cell Biology*, 11:1166-1173
- Dubbert M, Werner C (2018) Water fluxes mediated by vegetation: emerging isotopic insights at the soil and atmosphere interfaces. *New Phytolog.* 0:1-18
- Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae.* 196:3-14
- Esau K (1977) *Anatomy of Seed Plants*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York: [i]-xx, 1-550.
- Ferreira A, Quecine MC, Lacava PT, Oda S, Azevedo JL, Araújo WL, Fisher DB (2008) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemistry and Cell Biology.* 16:92-96.
- Ferreira BGA, Zuffellato-Ribas KC, Carpanezzi AA, Tavares FR, Koehler HS (2009) Metodologias de aplicação de AIB no enraizamento de estacas semilenhosas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. *Rev. Bras. Plantas Med.* 11(2):196-201
- Freitas SS (2007) Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas. In: Silveira APD, Freitas SS. *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental*. Instituto Agrônômico de Campinas. p.1-20.
- Forde BG, Clarkson DT (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research.* 30:1-90
- Forde BG (2014) Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Current Opinion in Plant Biology.* 21:30-36
- Gajewska E, Skłodowska M (2007) Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals.* 20:27-36
- Galdiano Jr. RF, Pedrinho EAN, Castellane TCL, Lemos EGM (2011) Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. *Rev Brasil Ciênc Solo* 35:729-737
- Ge Y, Fang X, Liu W, Sheng L, Xu L (2018) Adventitious lateral rooting: the plasticity of root system architecture. *Physiol Plant.* <https://doi.org/10.1111/ppl.12741>
- Geiss G, Gutierrez L, Bellini C (2009) Adventitious root formation: new insights and perspective. In: Beeckman T (ed) *Root Development*. John Wiley & Sons Ltd., London, pp 127-156
- Giehl RFH, von Wirén N (2014) Root nutrient foraging. *Plant Physiol.* 166:509-517
- Graner EM, Brondani GE, Almeida CV, Batagin-Piotto KD, Almeida M (2014) Study of senescence of the *Bactris gasipaes* Kunth *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 120:1169-1189

- Hackett WP (1987) Donor plant maturation and adventitious root formation. In: Davies TD, Haissig BE, Sankhla N (Ed.). Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides, p. 11-28. (Advances in Plant Sciences Series, 2).
- Hammatt N (1993) Micropropagation of fastigate bird cherry (*Prunus padus* L.) and adventitious shoot formation from leaves. *Journal of horticultural Science*. 68(6):975-981
- Handro W, Floh EIS (1990) Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: Torres AC, Caldas LS. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPq p.203-212.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies Jr FT, Geneve RL (2002) Plant propagation principles and practices. 7th ed. New Jersey: Prentice-Hall. 880p.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies Jr FT, Geneve RL (2011) Principles of propagation by cuttings. In: Hartmann HT, Kester DE, Davies Jr FT, Geneve RL (ed.) Hartmann & Kester's Plant propagation: principles and practices. Prentice Hall, New Jersey, pp. 280-343
- Hernández I, Alegre L, Breusegem FV, Munné-Bosch S (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*. 14(3)
- Higashi EM, Silveira RLVA, Gonçalves AN (2004) Nutritional monitoring and fertilization in clonal macro, mini and microgardens. In: Gonçalves JLM, Benedeti V (Eds.) Forest nutrition and fertilization. Piracicaba: IPEF:195-221
- Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. Deut. Landwirtsch. Ges.* 98:59-78
- Hungria M, Campo RJ, Mendes IC (2001) Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja – (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516-7860, n.35) (Circular Técnica / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-0187, n.13), 48p.
- Kauffman GL, Kneivel DP, Watschke TL (2007) Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Sci*. 47:261–267
- Kevers C, Hausman JF, Faivre-Rampant O, Evers D, Gaspar T (1997) Hormonal controls of adventitious rooting: progress and questions. *Angew Bot*. 71:71-79
- Khokhar I, Haider MS, Mukhtar IAA, Mushtaq S (2011) Evaluation of antagonistic activity of soil bacteria against plant pathogens fungi. *Pakistan J Phytopathol* 23:166-169
- Kirkby EA, Römheld V (2007) Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. Encarte técnico: Informações Agronômicas, International Plant Nutrition Institute. N° 118, 24p.
- Kong X, Zhang M, Smet ID, Ding Z (2014) Designer crops: optimal root system architecture for nutrient acquisition. *Trends in Biotechnol*. 32(12):597-598
- Lakshmanan V, Selvaraj G, Bais HP (2014) Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Plant Physiol* 166:689–700
- Lambais MR, Carvalho JC, Maluche-Baretta CR, Büll RC (2005) Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. *Tópicos em Ci. solo*. 4:43-84

- Lederberg J, McCray AT (2001) 'Ome Sweet Omics'- a genealogical treasury of words. *The Scientist* 15:7-8
- Leone GF (2013) Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 101p.
- Li SW, Xue L, Xu S, Feng H, An L (2009) Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *The Botanical Review* 75(2):230-247
- Lima CCM (1998) Uso de aditivos e cofatores na capacidade de enraizamento de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 95p.
- Lima CC, Ohashi ST (2016) Substrato no enraizamento de estacas provenientes de mudas de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*. *Enciclopédia biosfera*. 13(23):1270-1282
- Ludwig-Müller J (2000) Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 32:219-230
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrekton A, Kunin V, Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488:86-90
- Marchioro LET (2005) Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 74 p.
- Mendes R, Kruijt M, Bruijn I, Dekkers E, Van Der Voort M, Schneider JHM, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PAHM, Raaijmakers JM (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Scienc*. 332:1097-1100
- Mengel K, Kirkby EA (1987) Principles of plant nutrition. Switzerland.: Bern: Intern. Potash Institute, 687p.
- Mercante FM, Franco AA (2000) Expressão dos genes *nod* de *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:301-310
- Mercante FM, Goi SR, Franco AA (2002) Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. *Universidade Rural*. 22(1):65-81
- Norberto, PM (1999) Efeitos da época de poda, cianamida hidrogenada, irrigação e ácido indolbutírico na colheita antecipada e enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 89p.
- Ofek M, Voronov-Goldman M, Hadar Y, Minz D (2014) Host signature effect on plant root-associated microbiomes revealed through analyses of resident vs active communities. *Environm Microbiol* 16:2157-2167

- Ono EO, Rodrigues JD (1996) Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares. Jaboticabal: FUNEP, 83p.
- Ortíz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 4(8):701-712
- Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:93-113
- Pacheco-Villalobos D, Hardtke CS (2012) Natural genetic variation of root system architecture from *Arabidopsis* to *Brachypodium*: towards adaptive value. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367:1552–1558
- Pacurar DI, Pacurar ML, Bussell JD, Schwambach J, Pop TI, Kowalczyk M, Gutierrez L, Cavel E, Chaabouni S, Ljung K, Fett-Neto AG, Pamfil D, Bellini C (2014) Identification of new adventitious rooting mutants amongst suppressors of the *Arabidopsis thaliana* superroot2 mutation. *J. Exp. Bot.* 65(6):1605–1618
- Pandey D, Pathak RK (1981) Effect of Rootstocks, IBA and Phenolic Compounds on the Rooting of Apple Cuttings. *Propagation of Horticulture.* 13:105-110
- Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *App Environm Microbiol* 68:3795-3801
- Peer WA, Murphy AS (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science* 12(12)
- Pérez-Jaramillo JE, Mendes R, Raaijmakers JM (2015) Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology* 1:1
- Peters NK, Frost JW, Long SRA (1986) plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233:977-980
- Pimenta JA (2012) Relações Hídricas. In: Fisiologia vegetal. Kerbauy GB (Ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2ª ed. 431p.
- Porto AJ, Bosqueti BB (2017) Uso da água no enraizamento de estacas de amoreira. *Pesq. Tecnol.* 14(2):1-6
- Ramage CM, Williams RR (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 38:115-124
- Robinson D (1994) The response of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist* 127:635-674.
- Rovira AD, Davey CB (1974) Biology of the rhizosphere. In: Carson EW (ed.) *The plant root and its environment.* Charlottesville: Virginia Press. p.153-204
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan D, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Letters* 278:1-9
- Sako H, Soares JE, Silva LA, Balardin R (2005) Relações de enraizamento e cálcio no solo para alta produtividade da safra 15/16. *Boletim Técnico* 1:CESB (Comitê Estratégico Soja Brasil), 15p.

- Santana MC (2018) Análise da comunidade de fungos em áreas de monoculturas e consórcio de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 110p.
- Sati A, Sati AC, Negi JS, Sati OP (2018) Mineral composition of *Berberis aristata* DC roots. *Analytical Chemistry Letters*. 8(3):361-367
- Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycol Res* 109:661-686
- Shahzad Z, Amtmann A (2017) Food for thought: how nutrients regulate root system architecture. *Current Opin Plant Biol*. 39:80-87
- Siqueira JO, Nair MG, Hammerschmidt R, Safir GR (1991) Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 10:63-121
- Smith S, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Boston: Academic Press 787p.
- Sorin C, Bussell JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, McKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G, Bellini C (2005) Auxin and Light Control of Adventitious Rooting in *Arabidopsis* Require ARGONAUTE. *The plant cell*. 17:1343–1359
- Strobel GA (2003) Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5:535-544
- Sukumar P, Legué V, Vayssières A, Martin F, Tuskan GA, Kalluri UC (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant, Cell and Environment* 36:909-919
- Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA, Netrusov AI (2006a) Hormones and hormone-like substances of microorganisms: a review. *Appl Biochem Microbiol* 42:229-235
- Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA, Netrusov AI (2006b) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl Biochem Microbiol* 42(2):117–126
- Thimann KV, Went FW (1934) On the chemical nature of the root-forming hormone of plants. *Proc Kon Akad Wetensch* 37:456-458
- Villacorta-Martín C, Sánchez-García AB, Villanova J, Cano A, Rhee MVD, de Haan J, Acosta M, Passarinho P, Pérez-Pérez JM (2015) Gene expression profiling during adventitious root formation in carnation stem cuttings. *BMC Genomics*. 16:789
- Zhang Y, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ (2015) Engineering the plant rhizosphere. *Current Opinion in Biotechnology*, 32:136–142



### 3 APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTES NO PROCESSO DE ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE EUCALIPTO

#### Resumo

A técnica de miniestaquia associada ao uso de AIB é uma prática comum na clonagem de genótipos de eucaliptos, no entanto, é recorrente observar distinções organográficas nas raízes adventícias provenientes da miniestaca, bem como na estrutura e arquitetura do sistema radicular desenvolvido. Assim, espera-se que o uso de bioestimulantes com potencial para sintetizar reguladores de crescimento vegetais, como o ácido tânico, produto secundário do metabolismo vegetal e o Algaren BZn<sup>®</sup>, fertilizante composto por extrato da alga *Ecklonia maxima* enriquecido com boro, zinco, represente uma alternativa ecológica e econômica para potencializar a rizogênese no processo de clonagem para multiplicação maciça de mudas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a atuação destes produtos nos parâmetros morfofisiológicos de três espécies de eucaliptos (*E. urograndis*; *E. benthamii* e *E. urophylla*), principalmente no que se refere à formação de raízes e sua funcionalidade. Para tanto foram elaborados quatro tratamentos associados com 1ppm de ácido indol butírico (AIB) em talco (T1: CONTROLE; T2: ÁCIDO TÂNICO; T3: ALGAREN BZN<sup>®</sup> e T4: T2 + T3), nas concentrações de 250mg/L de ácido tânico e 1ml/L de Algaren BZn<sup>®</sup>. As miniestacas nos respectivos tratamentos foram mantidas por 35 dias em casa de vegetação. Após este período, constatou-se que o uso de ácido tânico foi o melhor resultado obtido em todos os clones estudados.

Palavras-chave: Enraizamento; Ácido tânico; Composto fenólico; Algaren BZn<sup>®</sup>; Extrato de alga

#### Abstract

The minicutting technique associated with the AIB use is a common practice to cloning eucalyptus genotypes; however, it is common to observe morphological distinctions in the adventitious roots derived from the minicutting, as well as in the structure and architecture of this root system. Thus, it is expected that the use of biostimulants with potential to produce plant growth regulators such as tannic acid, a byproduct of vegetable metabolism and Algaren BZn<sup>®</sup>, a fertilizer composed by the *Ecklonia maxima* extract enriched with boron, zinc, represents an ecological and economical alternative, to potentiate the rhizogenesis in the cloning process to improve seedlings multiplication. Thus, the aim of this research was to verify if the application of these products affects morphophysiological parameters of three species (*Eucalyptus urograndis*, *E. benthamii* and *E. urophylla*), especially with regard to root formation and its functionality. For this, four treatments associated with 1ppm of indolebutyric acid (IBA) with talc as a vehicle (T1: CONTROL, T2: TANNIC ACID,

T3: ALGAREN BZN<sup>®</sup> and T4: T2 + T3) were tested in the concentrations of 250mg/L for tannic acid and 1ml/L for Algaren BZN<sup>®</sup>. The minicuttings in those treatments were maintained for 35 days under greenhouse conditions. After this period, it was found that tannic acid use was the best result obtained in all clones studied.

Keywords: Rooting; Tannic acid; Phenolic compound; Algaren BZN<sup>®</sup>; Seaweed extract

### 3.1 Introdução

O uso de auxinas para promover o enraizamento adventício é conhecido desde 1934, quando Thimann e Went reportaram os resultados de seus experimentos. Desde então, este regulador de crescimento vem sendo usado nos processos de estaquia em inúmeras espécies arbóreas, proporcionando maior porcentagem, velocidade, qualidade e uniformidade no enraizamento (Hartmann et al. 2002; Borges et al. 2011). A atuação das auxinas está diretamente relacionada à divisão e alongamento de células meristemáticas, à diferenciação da raiz primária e à mobilização de reservas nutricionais para o local do enraizamento (Davis; Haissig; Sankhla 1988). Além das auxinas, os vegetais produzem e secretam diversos metabólitos na rizosfera, sendo eles, os metabólitos primários, constituídos por ácidos orgânicos, carboidratos e aminoácidos e, os metabólitos secundários, designados como “produtos naturais das plantas”. Esses últimos apresentam forte impacto na rizosfera, por mediar sua interação com outras plantas, animais e microrganismos. A importância destes produtos do metabolismo secundário das plantas durante o processo de enraizamento foi constatada em trabalhos clássicos, como as pesquisas desenvolvidas por Bartolini; Tattini (1986) e Curir et al. (1990), os quais evidenciaram que a associação de auxinas com fenóis e flavonoides favorecem este evento morfogênico.

Compostos fenólicos atuam como antioxidantes, protegendo o ácido indolacético (AIA) da oxidação, alterando seu metabolismo oxidativo e regulando os teores de auxina dentro dos tecidos. De acordo com Fogaça (2003) o floroglucinol e o ácido tânico também atuam como protetores das auxinas e são utilizados na fase de

indução de raízes. Outros produtos utilizados para otimizar a rizogênese em estacas de interesse comercial de diversas espécies, são os extratos de algas, aplicados como fertilizantes, embora não sejam, e bioestimulantes, constituídos por substâncias húmicas, hormônios e aminoácidos (Du Jardin 2015; Kauffman; Kneivel; Watschke 2007; Carvalho; Castro 2014; Araújo 2016). Considerando a frequente recalcitrância à rizogênese em estacas de eucalipto, gênero de extrema importância para atividades socioeconômicas brasileiras e, destacando que a estratégia de obtenção de mudas é realizada preferencialmente via estaquia, o objetivo deste trabalho foi verificar a ação de dois bioestimulantes, ácido tânico e Algaren BZn<sup>®</sup>, produto comercial constituído pela alga *Ecklonia maxima*, em três espécies de eucaliptos, *E. urograndis*, *E. benthamii* e *E. urophylla*.

### **3.2 Material e métodos**

#### **3.2.1 Material vegetal**

Foram utilizadas brotações provenientes de minicepas de minijardim clonal de eucaliptos (*E. urophylla*; *E. benthamii* e *E. urograndis*), propagadas originalmente via estaquia convencional. O material vegetal foi cedido pelo IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais) localizado no município de Piracicaba/SP, situado entre as coordenadas geográficas 22°42' de latitude sul e 47°38' de longitude oeste de Greenwich, e a 138 km de distância da Capital do Estado de São Paulo.

As minicepas são mantidas em canaletão há 4 anos com fertirrigação diária e foram plantadas em sistema de semi-hidroponia formando um mini-jardim clonal (Figura 1).



Figura 1 - Jardim clonal de *Eucalyptus* estabelecido no Instituto de Pesquisa e Estudo Florestal (IPEF), Piracicaba/SP.

### 3.2.2 Preparo das miniestacas

Os ápices das brotações foram coletadas com aproximadamente 15 cm de comprimento e pelo menos 3 pares de folhas totalmente expandidas para a estaquia (Figura 2). As áreas foliares foram reduzidas para 50%, com exceção para o *E. benthamii*, o qual suas folhas mantiveram-se íntegras, devido seu formato oval. A base das miniestacas foi cortada em bisel na extremidade proximal e por 10 segundos foi colocada em contato com AIB em pó na concentração de 1ppm e em seguida estaqueada em tubetes de 12 cm de comprimento por 3,5 cm de diâmetro com capacidade total de 120 cm<sup>3</sup>, preenchido com substrato Carolina Soil<sup>®</sup>. As miniestacas foram mantidas em casa de vegetação onde receberam fertirrigação por nevoeiro em fluxo de 32 L/h com bicos fogger, regulada por medidor de condutividade elétrica da água (EC) aferido para 2,5 e distribuída diariamente em fluxo de 2.500 ml por metro linear a cada 15 minutos, no período de 30 segundos ao longo de 7 horas (das 10 às 17h).



Figura 2 - Brotações de miniestacas de eucaliptos, *E. urograndis*; *E. benthamii* e *E. urophylla*, respectivamente

Ao longo dos 35 dias de experimento, com o auxílio de termo-higrômetro foram coletados dados de temperatura e umidade relativa do ar na casa de vegetação, gerando uma média ao longo das cinco semanas analisadas, constatando-se assim, mínimas, médias e máximas de temperatura e umidade (Figuras 3).

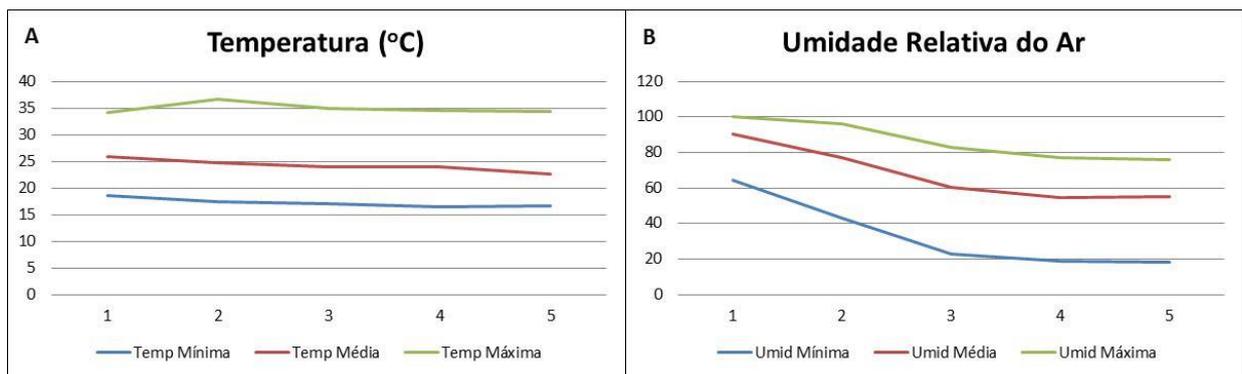


Figura 3 - Dados coletados das médias de temperatura (A) e umidade (B) em casa de vegetação, ao longo das cinco semanas de experimento com o auxílio de termo-higrômetro.

### 3.2.3 Testes preliminares

Testes preliminares foram realizados para definir as concentrações mais relevantes de ácido tânico e Algaren BZn<sup>®</sup> aplicadas no experimento com as miniestacas de *Eucalyptus*. Os resultados definiram as quantidades: 250mg/L de ácido tânico e 1ml/L de Algaren BZn<sup>®</sup>.

### 3.2.4 Tratamentos

Uma semana após o plantio foram adicionados na base das miniestacas os seguintes tratamentos: T1: Controle (água destilada); T2: ácido tânico (250 mg/L); T3:

Algaren BZn<sup>®</sup> (1ml/L) e T4: T2 + T3, os quais foram aplicados todas as semanas ao longo de 35 dias. Observe na Figura 4 que as bandejas de tubetes referentes aos experimentos foram “protegidas” por bandejas extras para estabelecer um efeito de bordadura.



Figura 4 - Miniestacas em casa de vegetação. Quadrados vermelhos representam bandejas de tubete contendo os experimentos nos quatro tratamentos e três blocos de cada; setas brancas representam bandejas estabelecendo o efeito bordadura.

### 3.2.5 Avaliações do desenvolvimento das miniestacas

Ao longo dos 35 dias de experimento as miniestacas foram avaliadas semanalmente para verificar a taxa de sobrevivência em cada tratamento, sendo os dados medidos por meio de notas de acordo com o método adotado por Leone (2013) onde a nota Zero foi considerada a morte do vegetal, nota 1: ponderou como vigor reduzido; nota 2: vigor moderado e nota 3: correspondeu ao vigor elevado. Os dados referentes ao incremento no peso da massa fresca e seca do sistema aéreo e subterrâneo (raízes e/ou calos) das miniestacas foram aferidos após 35 dias de

cultivo. Foi contabilizado o número de raízes principais (originadas da base da miniestaca), bem como, o tamanho total das plantas e engrossamento da base da miniestaca (região do desenvolvimento radicular), ambos com o auxílio de um paquímetro. Os parâmetros volume, diâmetro, comprimento das raízes, e comprimento das radículas foi adquirido por meio de *scanner* (WinRHIZO®), no Laboratório de Melhoramento de Plantas Alógamas, da ESALQ/USP (Figura 5).

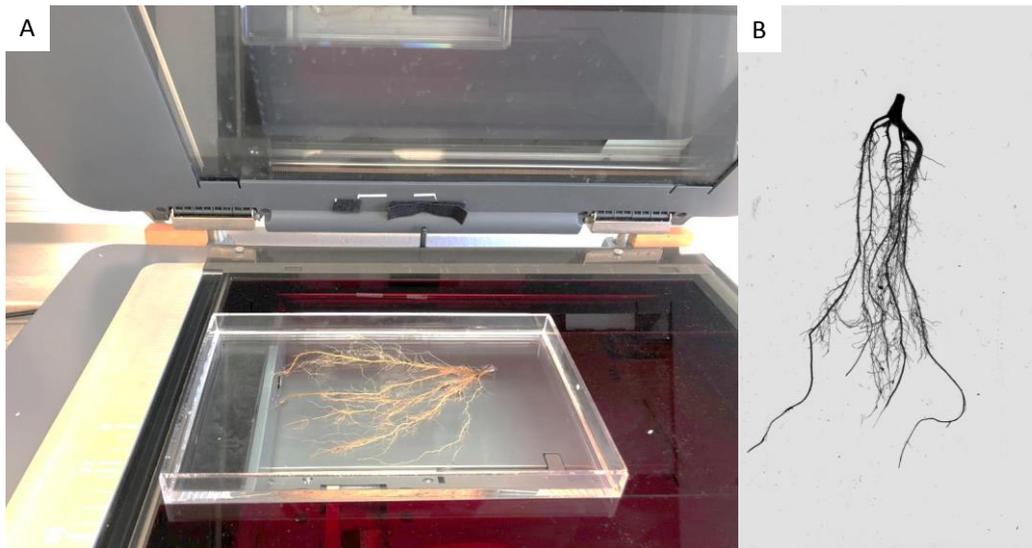


Figura 5 – Sistema radicular de miniestacas de *Eucalyptus* spp. avaliadas em *scanner*. Material pronto para ser escaneado (A); Sistema radicular escaneado (B)

### 3.2.6 Análises histológicas

Amostras da base das miniestacas foram fixadas em solução Karnovsky (1965), desidratadas em série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% v/v) e inclusas em resina de hidroxiethyl metacrilato (Historesin, Leica®, Heidelberg, Germany) de acordo com recomendações do fabricante. Os blocos contendo as amostras foram seccionados de modo transversal a 10  $\mu$ m de espessura empregando navalhas de aço do tipo C acopladas a micrótomo rotativo manual. Os cortes obtidos foram submetidos à dupla coloração com o reagente ácido periódico de Schiff e Naphtol blue black (Fisher 1968; Almeida et al. 2012) e montados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®).

As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2®) sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG® (SDC-313).

### **3.2.7 Delineamento experimental e coleta dos dados**

O delineamento experimental utilizado neste trabalho foi 4 x 3 x 3 (4 tratamentos x 3 espécies de *Eucalyptus* x 3 blocos), com 15 repetições cada, totalizando 540 amostras.

Os dados dos parâmetros morfofisiológicos das miniestacas foram analisados com o auxílio do índice baseado em soma de “ranks” (Mulamba; Mock 1978), o qual hierarquiza os parâmetros por atribuição de valores absolutos mais elevados àqueles de melhor desempenho, classificando-os em ordem favorável de cada parâmetro analisado. Por fim, as ordens são somadas, resultando no índice de seleção, como descrito a seguir:  $I = r_1 + r_2 + \dots + r_n$ , sendo que  $I$  é o valor do índice para determinado indivíduo ou família;  $r_j$  é a classificação (ou "rank") de um indivíduo em relação ao  $j$ -ésimo caráter;  $n$  é o número de caracteres considerado no índice (Costa et al. 2004; Cruz; Carneiro 2008).

Em relação ao sistema subterrâneo das miniestacas nos respectivos tratamentos geraram uma matriz de presença e ausência de calos. Essa matriz foi analisada no programa Past Estatistic (Hammer; Harper; Ryan 2001) através do teste de coordenadas principais PCoA, utilizando o algoritmo de Bray-Curtis (Bray; Curtis 1957).

## **3.3 Resultados**

### **3.3.1 Testes preliminares e Tratamentos**

Os resultados obtidos nos testes preliminares demonstraram que dosagens acima de 250 mg/L de ácido tânico resultam em oxidação e subsequente morte das miniestacas e, a menor concentração (150 mg/L) mostrou-se semelhante ao observado no controle, ou seja, sem resultado significativo. Com relação ao Algaren BZn®, a

melhor resposta foi a indicada pelo fabricante (1ml/L) sendo que as demais resultaram na proliferação excessiva de algas e desenvolvimento de fungos, ocasionando a necrose das miniestacas. Assim, estabeleceu-se as concentrações dos bioestimulantes a serem aplicadas nas miniestacas, como 250 mg/L para ácido tânico e 1ml/L para Algaren BZn®.

### 3.3.2 Avaliação do desenvolvimento das miniestacas nos tratamentos

As mudas desenvolvidas por miniestaquia após 35 dias em tratamento com bioestimulantes (Figura 6) foram avaliadas e os parâmetros morfofisiológicos geraram um índice baseado em soma de “ranks”, que hierarquizaram os resultados por meio de atribuição notas, sendo que os menores valores representam resultados mais satisfatórios de um determinado tratamento quando em comparação com outro da mesma espécie. A Tabela 1 representa os dados gerados a partir desta análise para as três espécies (*E. urograndis*, *E. benthamii* e *E. urophylla*), na qual se optou pelo uso de uma escala de cor para representar valores inferiores aos superiores, representando, portanto, do melhor ao pior tratamento.



Figura 6 – Mudas de eucaliptos obtidas por miniestaquia. *E. urograndis* (A); *E. benthamii* (B) e *E. urophylla* (C)

Tabela 1 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em *E. urograndis*; *E. benthamii* e *E. urophylla*. T1: controle (apenas água); T2: 250mg/L de Ácido Tânico; T3: 1ml/L de Algaren BZn® e T4: T2 + T3

Espécie	Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros														Índice
		V	NR	C-SA	EBE	DR	VR	CR	CR<=0,5	0,5<CR<=4	CR>4,5	MF-SS	MS-SS	MF-SA	MS-SA	
<i>E. urograndis</i>	T1	2	1	3	1	1	4	3	4	4	2	4	4	1	1	35
	T2	3	3	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	3	25
	T3	1	2	1	1	3	2	2	2	2	3	1	2	4	4	30
	T4	4	4	4	3	4	3	2	3	3	3	4	3	3	3	2
<i>E. benthamii</i>	T1	4	2	3	1	3	3	2	2	2	1	3	4	4	4	38
	T2	3	1	1	3	4	4	1	1	1	4	1	1	2	1	28
	T3	1	4	2	2	2	2	3	3	3	3	2	3	1	3	34
	T4	2	3	4	3	1	1	4	4	4	2	4	2	3	2	39
<i>E. urophylla</i>	T1	4	4	4	4	4	4	2	2	2	4	4	2	3	2	45
	T2	2	2	1	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19
	T3	1	3	3	2	1	2	3	3	3	3	2	3	4	4	37
	T4	3	1	2	1	3	3	4	4	4	2	3	3	1	1	35

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NR: número de raízes; C-SA: comprimento do sistema aéreo; EBE: engrossamento da base da miniestaca; DR: diâmetro das raízes; VR: volume das raízes; CR: comprimento das raízes; CR<=0,5: comprimento das raízes menor ou igual a 0,5 centímetros; 0,5<CR<=4: comprimento das raízes entre 0,5 e 4 centímetros; CR>4,5: comprimento das raízes maior que 4,5 centímetros; MF-SS: massa fresca do sistema subterrâneo; MF-SA: massa fresca do sistema aéreo; MS-SS: massa seca do sistema subterrâneo e MS-SA: massa seca do sistema aéreo.

As avaliações realizadas para analisar o experimento com bioestimulantes mostram que independentemente da espécie analisada, o tratamento T2 (ácido tânico), apresentou os melhores resultados, quando analisados pelo índice de soma de classificação (Tabela 1). E, no aspecto geral, a somatória final do índice ficou muito próxima entre os demais tratamentos, além disso, não foi observado um padrão de resultados entre eles. Assim, para melhor compreensão dos dados e visualização do efeito de cada tratamento nas três espécies, optou-se por fundir os gráficos, separando-os, desta vez, por tratamentos. Note que os dados são os mesmos já apresentados na Tabela 1, porém, rearranjados para melhor visualização (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

Tabela 2 – Adaptação dos dados obtidos no índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em *E. urograndis*; *E. benthamii* e *E. urophylla*. Sendo T1: controle (apenas água)

Espécies	Tratamento	Notas atribuídas aos parâmetros														
		V	NR	C-SA	EBE	DR	VR	CR	CR≤0,5	0,5<CR≤4	CR>4,5	MF-SS	MS-SS	MF-SA	MS-SA	Índice
<i>E. urograndis</i>	T1	2	1	3	1	1	4	3	4	4	2	4	4	1	1	35
<i>E. benthamii</i>	T1	4	2	3	1	3	3	2	2	2	1	3	4	4	4	38
<i>E. urophylla</i>	T1	4	4	4	4	4	4	2	2	2	4	4	2	3	2	45

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os dados apresentados nesta tabela foram adaptados da Tabela 1. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NR: número de raízes; C-SA: comprimento do sistema aéreo; EBE: engrossamento da base da miniestaca; DR: diâmetro das raízes; VR: volume das raízes; CR: comprimento das raízes; CR≤0,5: comprimento das raízes menor ou igual a 0,5 centímetros; 0,5<CR≤4: comprimento das raízes entre 0,5 e 4 centímetros; CR>4,5: comprimento das raízes maior que 4,5 centímetros; MF-SS: massa fresca do sistema subterrâneo; MF-SA: massa fresca do sistema aéreo; MS-SS: massa seca do sistema subterrâneo e MS-SA: massa seca do sistema aéreo.

Ao comparar todas as espécies, nota-se que T1 foi um tratamento intermediário, exceção dada apenas para *E. urophylla*, que apresentou-se como o pior tratamento aplicado.

Para *Eucalyptus urograndis*, observe nas Tabelas 1 e 2, que o tratamento 1 (controle), evidenciou valores favoráveis (nota 1) para os parâmetros incremento no peso da massa fresca e seca do sistema aéreo; engrossamento da base das miniestacas; número e diâmetro das raízes e, valores desfavoráveis (nota 4) quanto ao incremento nos pesos de massa fresca e seca do sistema subterrâneo; volume das raízes; comprimento das raízes ≤0.5cm e 0.5 < comprimento das raízes ≤ 4cm.

Em *E. benthamii*, T1 apresentou nota 1 apenas para engrossamento da base das miniestacas e comprimento das raízes > 4.5cm, nota 4 para os parâmetros: vigor das miniestacas; incremento dos pesos de massa seca do sistema subterrâneo e de massa fresca e seca do sistema aéreo (Tabela 2).

E por fim, em *E. urophylla* não foi observado nenhum parâmetro neste tratamento com nota 1, a melhor nota no índice de soma de classificação, sendo que, para os parâmetros: comprimento total do sistema aéreo e engrossamento da base das miniestacas; incremento do peso de massa seca do sistema subterrâneo; volume, número, diâmetro e comprimento das raízes > 4.5 cm; apresentaram-se com notas 4, classificando-o para esta espécie como o pior tratamento empregado, como observado nas Tabelas 1 e 2.

A Tabela 3 mostra os dados coletados para o tratamento com ácido tânico nas três espécies de eucalipto.

Tabela 3 – Adaptação dos dados obtidos no índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em *E. urograndis*; *E. benthamii* e *E. urophylla*. Sendo T2: 250mg/L de Ácido Tânico

Espécies	Tratamento	Notas atribuídas aos parâmetros														
		V	NR	C-SA	EBE	DR	VR	CR	CR≤0,5	0,5<CR≤4	CR>4,5	MF-SS	MS-SS	MF-SA	MS-SA	Índice
<i>E. urograndis</i>	T2	3	3	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	3	25
<i>E. benthamii</i>	T2	3	1	1	3	4	4	1	1	1	4	1	1	2	1	28
<i>E. urophylla</i>	T2	2	2	1	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os dados apresentados nesta tabela foram adaptados da Tabela 1. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NR: número de raízes; C-SA: comprimento do sistema aéreo; EBE: engrossamento da base da miniestaca; DR: diâmetro das raízes; VR: volume das raízes; CR: comprimento das raízes; CR≤0,5: comprimento das raízes menor ou igual a 0,5 centímetros; 0,5<CR≤4: comprimento das raízes entre 0,5 e 4 centímetros; CR>4,5: comprimento das raízes maior que 4,5 centímetros; MF-SS: massa fresca do sistema subterrâneo; MF-SA: massa fresca do sistema aéreo; MS-SS: massa seca do sistema subterrâneo e MS-SA: massa seca do sistema aéreo.

Em relação ao tratamento empregado com ácido tânico (T2) observou-se os melhores resultados (nota 1) em *E. urograndis* para os parâmetros: volume das raízes; incremento do peso de massa seca do sistema subterrâneo e para todos os dados coletados para comprimento das raízes (total; CR ≤0.5cm; 0.5< CR ≤ 4cm e CR > 4,5cm). A Tabela 3 destaca que este tratamento, esta espécie estudada, não apresentou para nenhum parâmetro analisado notas desfavoráveis, ou seja, com nota 4 no índice de soma de classificação.

Em *E. benthamii*, T2 apresentou notas favoráveis para os parâmetros: comprimento do sistema aéreo; incremento do peso de massa fresca e seca do sistema subterrâneo; número e comprimento total das raízes; comprimento das raízes ≤0.5cm e 0.5< comprimento das raízes ≤ 4cm. Notas inferiores (nota 4) foram observadas apenas para: comprimento das raízes > 4.5cm; diâmetro e volume das raízes (Tabela 3).

De forma inversa ao observado em T1 para *E. urophylla* (Tabela 2), em T2 esta espécie não apresentou notas desfavoráveis (nota 4) para nenhum dos parâmetros avaliados, apresentando nota 1 para: comprimento do sistema aéreo; incremento do peso de massa seca do sistema aéreo; volume das raízes e todos os dados coletados

para comprimento das raízes (total;  $CR \leq 0.5\text{cm}$ ;  $0.5 < CR \leq 4\text{cm}$  e  $CR > 4,5\text{cm}$ ) (Tabela 3).

Com relação ao tratamento com Algaren BZn<sup>®</sup>, os dados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Adaptação dos dados obtidos no índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em *E. urograndis*; *E. benthamii* e *E. urophylla*. Sendo T3: 1ml/L de Algaren BZn<sup>®</sup>

Espécies	Tratamento	Notas atribuídas aos parâmetros														Índice
		V	NR	C-SA	EBE	DR	VR	CR	CR≤0,5	0,5<CR≤4	CR>4,5	MF-SS	MS-SS	MF-SA	MS-SA	
<i>E. urograndis</i>	T3	1	2	1	1	3	2	2	2	2	3	1	2	4	4	30
<i>E. benthamii</i>	T3	1	4	2	2	2	2	3	3	3	3	2	3	1	3	34
<i>E. urophylla</i>	T3	1	3	3	2	1	2	3	3	3	3	2	3	4	4	37

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os dados apresentados nesta tabela foram adaptados da Tabela 1. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NR: número de raízes; C-SA: comprimento do sistema aéreo; EBE: engrossamento da base da miniestaca; DR: diâmetro das raízes; VR: volume das raízes; CR: comprimento das raízes; CR≤0,5: comprimento das raízes menor ou igual a 0,5 centímetros; 0,5<CR≤4: comprimento das raízes entre 0,5 e 4 centímetros; CR>4,5: comprimento das raízes maior que 4,5 centímetros; MF-SS: massa fresca do sistema subterrâneo; MF-SA: massa fresca do sistema aéreo; MS-SS: massa seca do sistema subterrâneo e MS-SA: massa seca do sistema aéreo.

O tratamento com Algaren BZn<sup>®</sup> (T3), apresentou notas consideradas favoráveis (1), para *E. urograndis* nos parâmetros: vigor; comprimento do sistema aéreo; incremento do peso de massa fresca do sistema subterrâneo e engrossamento da base das miniestacas, sendo este último também observado em T1. Este tratamento apresentou nota 4 para incremento dos pesos de massa fresca e seca do sistema aéreo (Tabela 4).

A Tabela 4 destaca que para *E. benthamii*, obteve-se nota 1 apenas em: vigor e incremento do peso de massa fresca do sistema aéreo e, nota 4 para número de raízes. Os demais parâmetros analisados foram intermediários para este tratamento.

O mesmo foi observado em *E. urophylla*, onde a maioria dos parâmetros analisados apresentou-se como intermediário, obtendo nota 1 apenas para vigor e diâmetro das raízes e nota 4 para incremento dos pesos de massa fresca e seca do sistema aéreo (Tabela 4).

A tabela 5 corresponde aos dados coletados em todas as espécies para o tratamento 4, que corresponde ao ácido tânico em combinação com Algaren BZn<sup>®</sup>.

Tabela 5 – Adaptação dos dados obtidos no índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em *E. urograndis*; *E. benthamii* e *E. urophylla*. Sendo T4: T2 + T3

Espécie	Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros														
		V	NR	C-SA	EBE	DR	VR	CR	CR<=0,5	0,5<CR<=4	CR>4,5	MF-SS	MS-SS	MF-SA	MS-SA	Índice
<i>E. urograndis</i>	T4	4	4	4	3	4	3	2	3	3	4	3	3	3	2	45
<i>E. benthamii</i>	T4	2	3	4	3	1	1	4	4	4	2	4	2	3	2	39
<i>E. urophylla</i>	T4	3	1	2	1	3	3	4	4	4	2	3	3	1	1	35

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os dados apresentados nesta tabela foram adaptados da Tabela 1. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NR: número de raízes; C-SA: comprimento do sistema aéreo; EBE: engrossamento da base da miniestaca; DR: diâmetro das raízes; VR: volume das raízes; CR: comprimento das raízes; CR<=0,5: comprimento das raízes menor ou igual a 0,5 centímetros; 0,5<CR<=4: comprimento das raízes entre 0,5 e 4 centímetros; CR>4,5: comprimento das raízes maior que 4,5 centímetros; MF-SS: massa fresca do sistema subterrâneo; MF-SA: massa fresca do sistema aéreo; MS-SS: massa seca do sistema subterrâneo e MS-SA: massa seca do sistema aéreo.

A Tabela 5 mostra que no tratamento 4 (ácido tânico + Algaren BZn®), o *E. urograndis* não apresentou notas consideradas superiores, ou seja, com nota 1 no índice de soma de classificação, apresentando nota 4 nos parâmetros: vigor e comprimento do sistema aéreo; número, diâmetro e comprimento das raízes > 4.5cm.

Para *E. benthamii* não houve o aparecimento de notas consideradas superiores, ou seja, com nota 1 no índice de soma de classificação, apresentando notas inferiores (nota 4) para os parâmetros: vigor e comprimento do sistema aéreo; número, diâmetro e comprimento das raízes > 4.5cm (Tabela 5).

A Tabela 5 revela que T4 obteve em *E. urophylla* notas consideradas favoráveis (nota 1) para: incremento dos pesos de massa fresca e seca do sistema aéreo; engrossamento da base das miniestacas e número de raízes, e apresentou notas 4 para alguns dados coletados para comprimento das raízes, tais como: comprimento das raízes; CR ≤ 0.5cm e 0.5 < CR ≤ 4cm.

Tendo em vista que, a miniestaquia com as espécies trabalhadas muitas vezes resulta em desenvolvimento de calos, optou-se pelo uso do termo “sistema subterrâneo” e, sabendo-se que o aparecimento destes não é interessante na formação de mudas, este parâmetro não foi analisado com os demais, pelo índice baseado em soma de “ranks”, considerando que a ordem de classificação desta análise foi realizada classificando os parâmetros que revelam resultados favoráveis a desfavoráveis.

Assim, para estes caracteres em mudas das 3 espécies estudadas foram classificadas com “presença” e “ausência” e, para melhor compreensão destes dados gerados, realizou-se a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), método que permite visualizar diferenças entre as amostras. Suas coordenadas principais separam as amostras por dissimilaridade, ou seja, através de quadrantes, permitindo a análise das diferenças existentes entre as espécies e os tratamentos aplicados (Figura 7). A análise de componentes principais apresentou 88,83% da variância total.

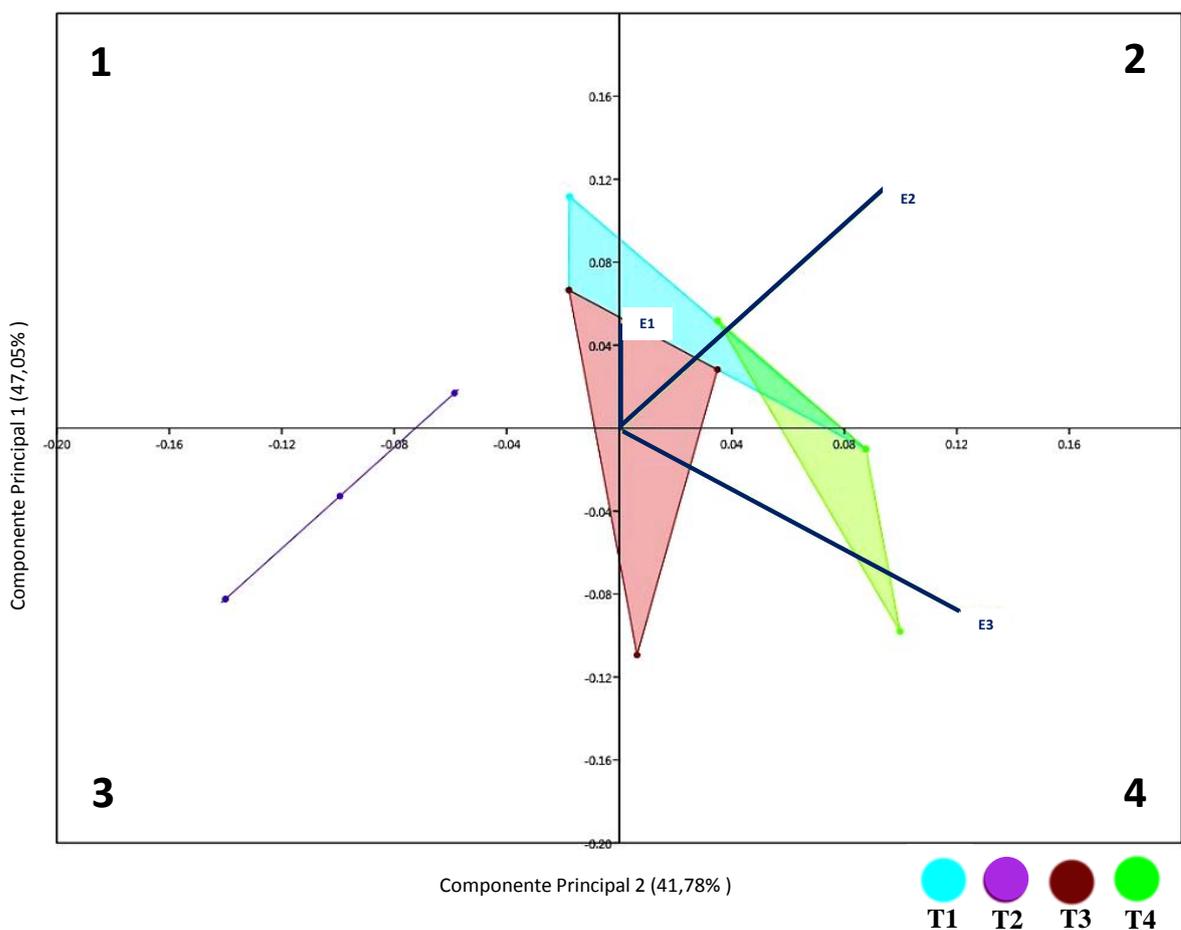


Figura 7 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) gerada a partir de resultados de matriz formada pela presença e ausência de calos no sistema subterrâneo em miniestacas de *Eucalyptus* spp. submetidos aos tratamentos com bioestimulantes pelo período de 35 dias. Sendo: E1: *E. urograndis*; E2: *E. benthamii*; E3: *E. urophylla* e, T1: controle; T2: ácido tânico; T3: Algaren BZn<sup>®</sup>; T4: T2 + T3

A PCoA permitiu visualizar a distribuição da presença de calos nos tratamentos ao longo de eixos de ordenação. Conjuntamente, os dois eixos plotados em cada ordenação apresentada, evidenciaram a distribuição dos dados, onde na Figura 7 é possível observar, diferenças com relação ao desenvolvimento de calos.

Após 35 dias com bioestimulantes em casa de vegetação, verificou-se dissimilaridade entre tratamentos e espécies trabalhados. Notou-se maior similaridade entre os tratamentos T3 e T4 em relação ao controle (T1), por se encontrarem nos mesmos quadrantes (2 e 4). A única exceção observada foi com ácido tânico (T2), que se encontra em parte no quadrante 1, indicando sua correlação com *E. benthamii*.

O tratamento 1 (controle) se correlaciona com todas as espécies, mas principalmente com *E. benthamii*. Já, T3 só não se correlaciona com *E. urophylla*, apenas com *E. benthamii* e *E. urograndis*. O T4, tratamento composto de T2 + T3, assim como T1, apresentou correlação com todas as espécies.

A Figura 8 representa o desenvolvimento de calos característicos observados em *E. urograndis* e *E. urophylla*.

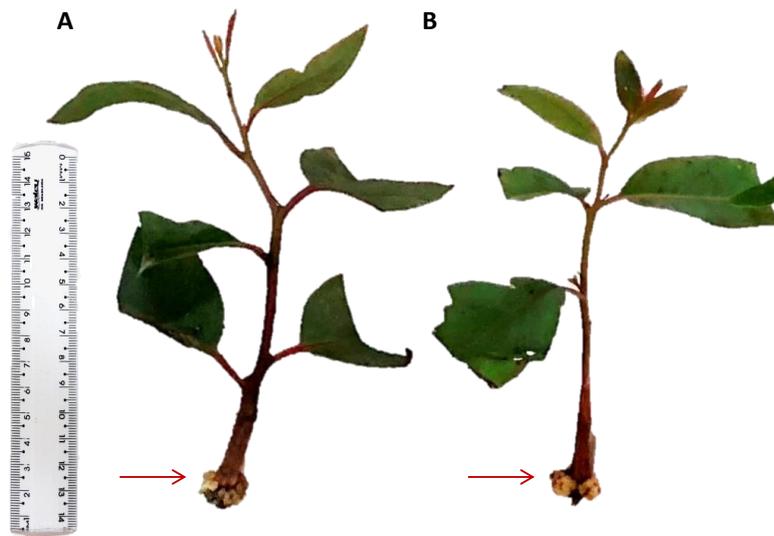


Figura 8 – Mudas de *E. urograndis* (A) e *E. urophylla* (B) obtidas a partir de miniestaca. Setas evidenciam a presença de calos na base das miniestacas

Diferentemente do observado para *E. urograndis* e *E. urophylla* (Figura 8), a espécie *E. benthamii*, também apresentou desenvolvimento de calos na base de algumas miniestacas. No entanto, quando estes se desenvolveram, não seguiram um padrão característico como nas duas outras espécies, evidenciado pela Figura 9. A espécie *E. benthamii* de modo geral, foi a que mais desenvolveu calos, como demonstrado pela PCoA (Figura 7) e, os sistemas subterrâneos em suas miniestacas

foram observados em três tipos: formação de calos; raízes diretas da base das miniestacas e/ou raízes desenvolvidas a partir de calos (Figura 9).

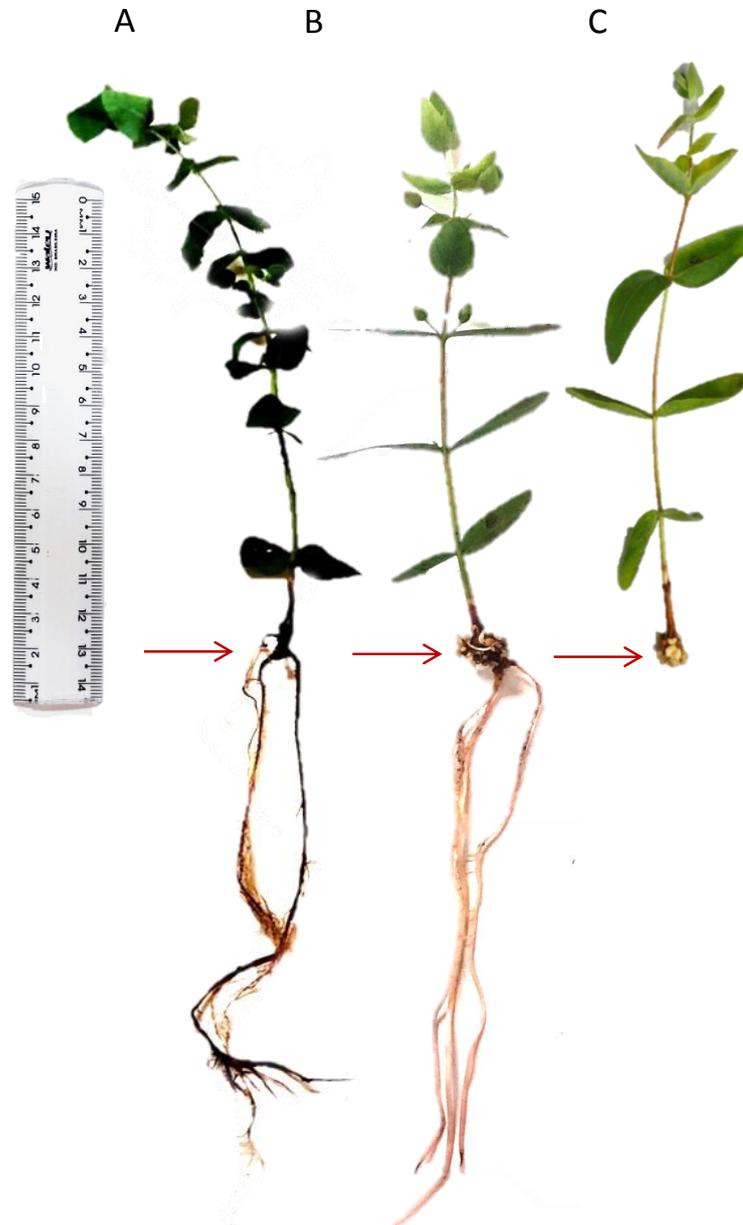


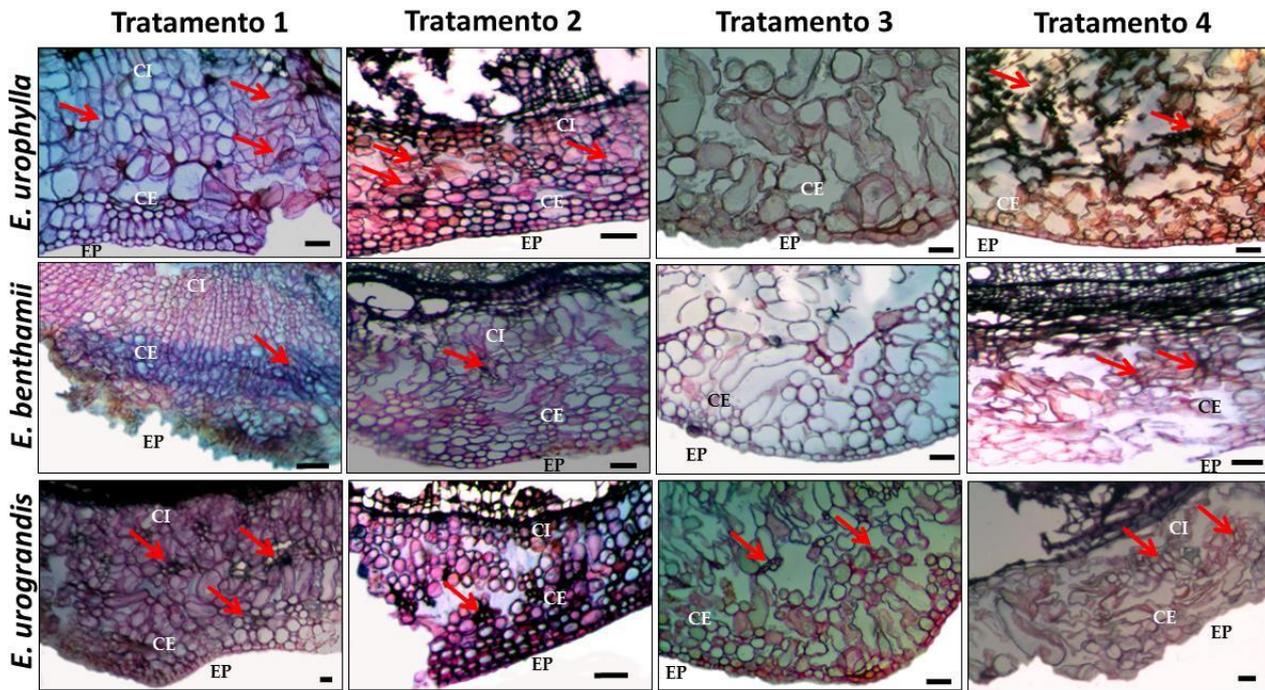
Figura 9 – Mudas de *E. benthamii* obtidas a partir de miniestaca, evidenciando os três tipos de sistemas subterrâneos formados (setas). Sendo eles: sistema radicular desenvolvido diretamente da base das miniestacas (A); sistema radicular desenvolvido a partir de calo na base da estaca (B) e formação de calos sem raízes (C).

### 3.3.3 Análises histológicas

As análises histológicas evidenciaram desenvolvimento de tecido calogênico na região cortical, com presença de células de distintas dimensões e formatos ocasionando a desestruturação tecidual típica do parênquima cortical (Figura 10).

Esta estrutura foi observada em todas as espécies estudadas neste trabalho, variando somente com relação à frequência e tamanho, independente do tratamento aplicado.

Figura 10 - Secções transversais da região proximal da base de miniestacas de *Eucalyptus* spp. Evidenciando a existência de um padrão à formação de tecido calogênico em todos os tratamentos e espécies. *Setas*: tecido



calogênico; *CI*: córtex interno; *CE*: córtex externo; *EP*: epiderme.

Estas análises permitiram observar que em todos os tratamentos houve a formação de calos na região do córtex interno, porém em nenhum dos casos houve a formação de raízes adventícias nestes tecidos, que somente rodeavam as raízes adventícias cuja origem era direta do câmbio vascular (Figura 11), comprovando, portanto, que este tecido calogênico não interferiu no processo rizogênico.

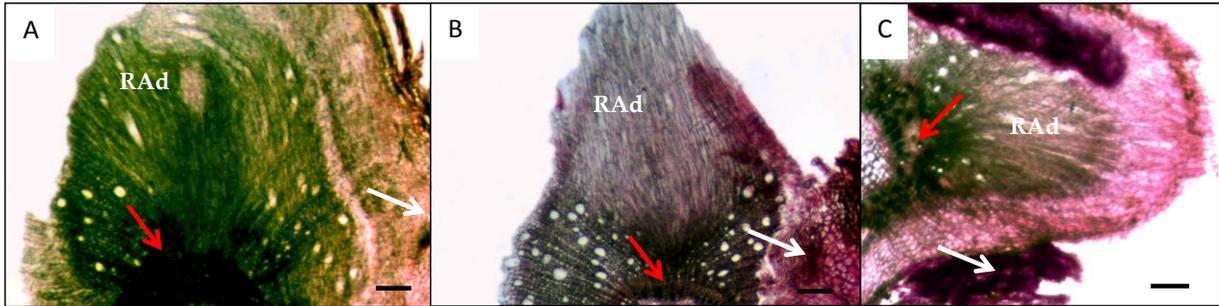


Figura 11 – Secções transversais da região proximal da base de miniestacas de *Eucalyptus* spp. Evidenciando a formação de raízes adventícias nas três espécies de *Eucalyptus*. A: *E. urograndis*; B: *E. benthamii* e C: *E. urophylla*. Setas vermelhas: região de origem das raízes adventícias no câmbio vascular; setas brancas: tecido calogênico; RAd: raízes adventícias

### 3.4 DISCUSSÃO

Considerando-se as dificuldades comumente encontradas na reprodução assexuada ou propagação clonal de espécies lenhosas, o estabelecimento da técnica de miniestaquia proporciona uma melhora no desenvolvimento do sistema radicular, reduzindo o tempo de formação da muda, afetando diretamente seu desempenho em campo (Alfenas et al. 2004; Azevedo et al. 2015), além da obtenção de mudas de elevada qualidade, para posterior plantio em campo.

De acordo com Almeida (2006), para o processo de miniestaquia de eucaliptos, as brotações podem ser colhidas diretamente do campo ou de minijardim clonal e, após serem estaqueadas, são mantidas em casa de vegetação por um período de 20 a 45 dias, dependendo da espécie, região e época do ano. Como neste trabalho, a fase de indução à emergência radicular de miniestacas foi conduzida em um centro de pesquisa com produção de mudas de eucalipto, seguiram-se seus padrões já estabelecidos, visando manter o mesmo tempo empregado no processo de estaqueamento. Desta forma, os experimentos foram limitados a 35 dias em casa de vegetação com temperatura e umidade controlados e aferidos diariamente (Figura 3). A fertirrigação por nevoeiro em fluxo manteve as mudas saudáveis e nenhum sintoma de toxicidade ou deficiência nutricional foi observado.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o tratamento composto apenas por AIB (T1: tratamento controle), apresentou-se como um tratamento intermediário, sendo que nas três espécies atribuímos a nota 4, ou seja, a nota mais

baixa no índice baseado em soma de “ranks” (Mulamba; Mock 1978), para o parâmetro incremento do peso de massa seca do sistema subterrâneo.

Aplicações de auxina, além de dar o start, otimizam a rizogênese, proporcionando maior porcentagem, velocidade e qualidade das raízes (Hartmann et al. 2002; Almeida et al. 2007), atribuições essas que, de acordo com Lajús et al. (2007) são fundamentais para o desenvolvimento da nova planta, pois, segundo o autor, não basta obter boa porcentagem de enraizamento, mas também é importante que o sistema radicular apresente qualidade, garantindo o vigor da miniestaca. As Figuras 6, 8 e 9 elucidam de forma sucinta as vias morfogênicas que podem ocorrer em miniestacas de eucalipto quando imersas em AIB.

Previamente à aplicação dos tratamentos com bioestimulantes, a extremidade proximal de todas as miniestacas foi colocada em contato com AIB em pó, e então conduzidas aos tubetes, seguindo as recomendações de Brondani et al. (2012), onde o autor destaca que a aplicação exógena de reguladores de crescimento vegetais podem melhorar o enraizamento adventício, considerando que o AIB, do grupo das auxinas, é o regulador mais utilizado para este fim (Wendling et al. 2000; Wendling; Xavier 2005; Brondani et al. 2010). É de conhecimento geral que a presença endógena e/ou exógena da auxina, inicia a divisão celular, o alongamento e subsequente diferenciação celular responsável pelo processo de rizogênese. A atividade cambial e a diferenciação do xilema são funções efetivamente importantes para os eventos fisiológicos expressos pelas respostas dos genes responsivos à auxina (Grones et al. 2015) que, resultarão no desenvolvimento da nova planta. Todavia, consta na literatura que ainda existem diferenças de respostas em relação ao percentual de enraizamento de miniestacas com a aplicação do AIB, que ocorre, não apenas entre as espécies do gênero *Eucalyptus*, mas também, entre clones de uma mesma espécie. No esquema representado pela Figura 12, mostra-se de forma didática como a aplicação de AIB dá o start para respostas celulares nas miniestacas, dando início à divisão celular, alongamento e diferenciação celular, ativando o câmbio vascular e consequente diferenciação vascular, gerando raízes adventícias e subsequentemente,

formando o sistema radicular que, caso essas raízes sejam funcionais, dará início às respostas fisiológicas, como o transporte acrópeto no cilindro vascular e absorção de nutrientes pelo sistema aéreo da planta.

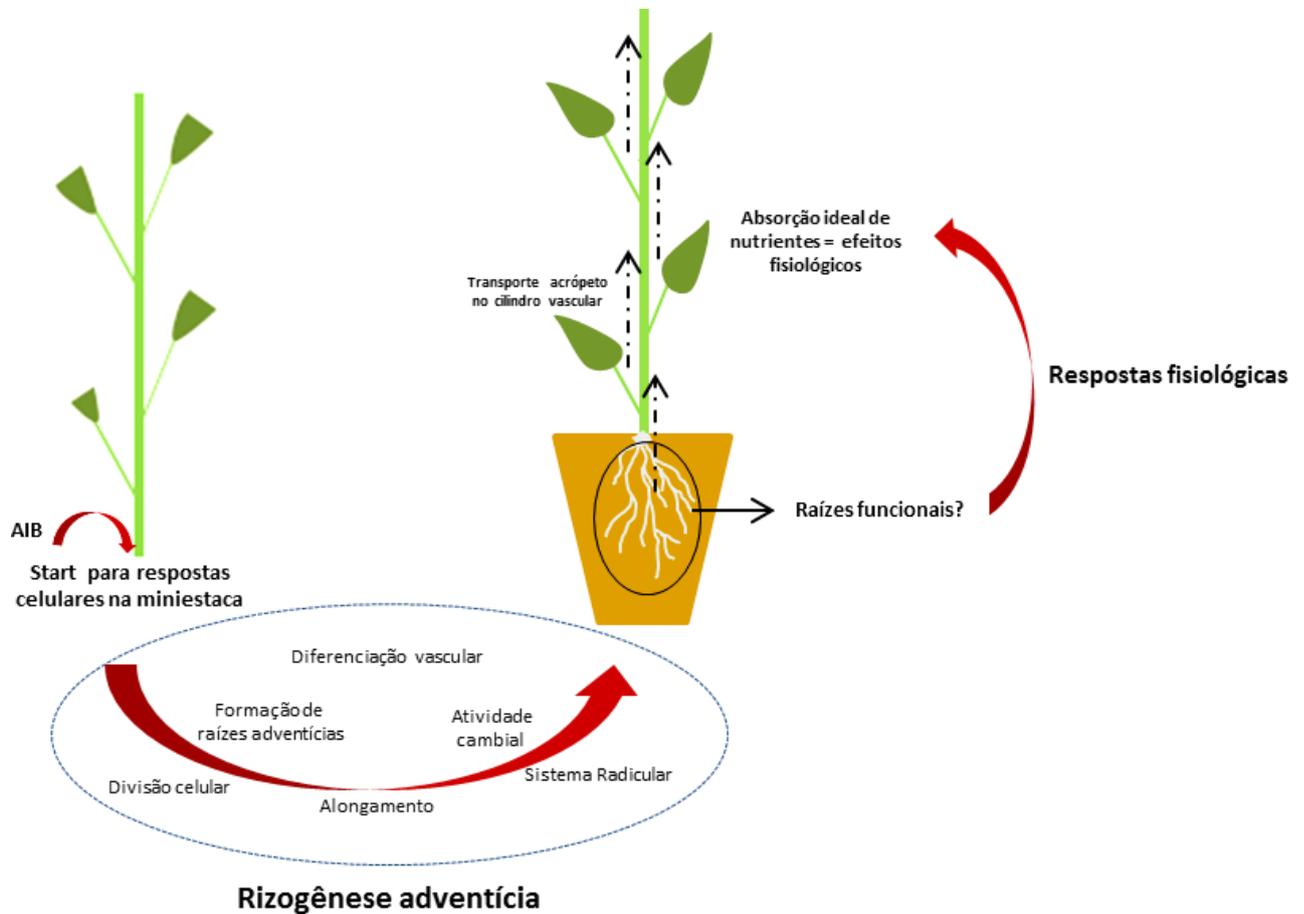


Figura 12 - Esquema representativo do evento de rizogênese adventícia

Vale lembrar que a análise de somatória de índice (Mulamba; Mock 1978) permite verificar a atuação dos tratamentos em cada um dos parâmetros analisados e, não somente no aspecto geral, como determinado por outras análises estatísticas. Tendo em vista que esse índice é obtido após o ordenamento das espécies analisadas quanto aos parâmetros avaliados no sentido desejado (notas superiores às inferiores), e posterior somatória das suas classificações (Teixeira et al. 2012).

Sendo assim, consideremos que o número de raízes, comprimento e incremento de massa fresca e seca dos sistemas aéreo e radicular, são parâmetros fundamentais para averiguar a produtividade do vegetal bem como o aproveitamento dos

nutrientes absorvidos pelas plantas (Echer; Dominato; Creste 2009). Neste trabalho podemos observar que, nas três espécies estudadas, o tratamento convencional, ou seja, apenas com AIB, se mostrou o pior no que se refere à assimilação de nutrientes pelas miniestacas, evidenciando que apesar da atuação positiva da auxina na indução à rizogênese, as raízes formadas não apresentaram eficiência fisiológica, ou seja, a absorção de nutrientes mostrou ser insuficiente para o desenvolvimento das plantas. Acreditamos que, apesar da auxina ter atuado nas suas funções básicas de divisão e alongamento das células, provavelmente a atividade cambial e consequente diferenciação vascular, não foram suficientes para estabelecer uma efetiva conexão vascular entre as raízes formadas e a miniestaca, conseqüentemente, essas não conseguiram desempenhar de forma eficaz suas funções fisiológicas de transporte de nutrientes para a parte aérea.

De acordo com Kirkby; Römheld (2007), o suprimento de micronutrientes pelas plantas ocorre de duas formas, por absorção foliar e também por absorção do pool solúvel em água presente na rizosfera, podendo afetar no crescimento e desenvolvimento da planta, corroborando com os dados obtidos por Leone (2013), no qual o pesquisador observou maiores médias de incremento do peso de massa seca para as amostras que obtiveram maiores taxas de absorção de nutrientes para *Eucalyptus* cultivado *in vitro*.

No presente trabalho foram aplicados, além do AIB, dois bioestimulantes o ácido tânico e Algaren BZn<sup>®</sup> (produto comercial composto pelo extrato de alga *Ecklonia maxima* acrescido de boro e zinco) na expectativa de otimizar o protocolo de enraizamento das miniestacas. Testes preliminares foram imprescindíveis para o estabelecimento das melhores concentrações dos bioestimulantes aplicados, inclusive cabe destacar que as concentrações determinadas corroboraram as divulgadas na literatura (Staden; Beckessesett; Rijkenberg 1995; Almeida 1999), e as recomendações do fabricante para o uso do extrato de algas.

O tratamento com ácido tânico se destacou como o melhor quando comparado aos demais. Este composto fenólico tem biossíntese originária de diferentes rotas, o

que o torna heterogêneo metabolicamente (Taiz; Zeiger 2009). De acordo com os autores, a rota metabólica do ácido chiquímico é a mais importante para as plantas superiores, sendo esta tão notável, que o conhecido herbicida glifosato atua bloqueando uma etapa desta rota metabólica (Santos et al. 2007). A rota do ácido chiquímico produz os aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano (Voet; Voet 2006), precursores de grande parte dos metabólitos secundários das plantas, tais como: pigmentos, flavonoides, auxinas, fitoalexinas, lignina e os taninos, rotas intermediárias a ela são utilizadas como substrato para outras vias metabólicas. Estima-se que, sob condições normais de desenvolvimento, 20% do carbono fixado pelas plantas podem ser direcionados para a rota do ácido chiquímico (Haslam 1993; Gomes 2011). Portanto, esta via é de extrema importância para o metabolismo vegetal e, além disso, ela está envolvida na produção de diversos produtos de interesse comercial, com destaque para os taninos condensados, flavonas, isoflavonas e ácido indolacético (AIA) (Gomes 2011).

Os taninos são moléculas fenólicas altamente reativas que formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares (Monteiro; Albuquerque; Araújo 2005), são facilmente oxidáveis tanto por enzimas vegetais específicas, quanto por influência de metais, como o cloreto férrico, responsável pela coloração de suas soluções. São compostos biodegradáveis capazes de formar complexos com proteínas e outras macromoléculas e minerais (Castro-Silva et al. 2004) e, em função disso, são eficientes na remoção de partículas presentes na água. Estas moléculas estão divididas de acordo com a estrutura química, em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados, sendo os primeiros compostos por galatoninas e elagitaninos, presentes em espécies de dicotiledôneas herbáceas e lenhosas (Mello; Santos 2001). Os taninos condensados, por sua vez, são constituídos por polifenóis e são mais frequentes na natureza onde exercem importante função antimicrobiana e antiviral, provavelmente por causar efeito de complexação entre os polifenóis e as proteínas, acarretando inibição enzimática (De Bruyne et al. 1999). Esta classe de taninos é encontrada em raízes, folhas, frutos e na periderme (casca) de árvores (Queiroz;

Morais; Nascimento 2002), como em *Acacia mimosa*, *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis*, *E. pellita*, entre outras.

Além disso, como ressaltado por Almeida (1999), o ácido tânico, assim como outros compostos fenólicos, pode atuar de modo direto ou indireto no desenvolvimento do sistema radicular, corroborando com os dados observados neste trabalho, no qual se observou de modo geral, os melhores resultados para os parâmetros relacionados ao sistema radicular (Tabelas 1 e 3), principalmente, por que este tratamento foi o que apresentou menor incidência de calos na base das miniestacas (Figura 7) exceção feita apenas para *E. benthamii*, lembrando que nesta espécie é muito comum a ocorrência de calos (Brondani 2012), e em T2, a incidência de formação destas estruturas foi menor, o que provavelmente ao comparar todos os tratamentos, este apresentou resultados mais favoráveis para este parâmetro.

Isto provavelmente é relacionado ao fato de que o processo de diferenciação celular que dá início ao enraizamento depende não só de hormônios, mas também de substâncias nitrogenadas, presentes no metabolismo secundário das plantas, muito importante na interação destas com o meio ambiente (Taiz; Zeiger 2009; Rocha et al. 2015), tais como aminoácidos, além de proteínas que são redistribuídos (Malavolta 2006), garantindo assim, maior desenvolvimento da formação do sistema radicular, aumentando o acúmulo de matéria seca em ambas as partes das mudas formadas (sistemas aéreo e radicular), como observado neste trabalho, corroborando com dados de Rocha et al. (2015).

Produtos orgânicos que sejam favoráveis ao meio ambiente e que aprimorem a eficiência de fertilizantes químicos vêm sendo cada vez mais utilizados para estimular o desenvolvimento vegetal, os denominados bioestimulantes (Ertani et al. 2015). Dragičević et al. (2015), com o intuito de aprimorar a eficiência nutricional de grãos de soja, adicionaram bioestimulantes em suas plantas, dentre eles o produto comercial Algaren BZn<sup>®</sup>, no entanto, assim como observado neste trabalho, para o tratamento 3 (Tabelas 1 e 4), a aplicação deste produto não foi satisfatória, ou seja, não obtivemos os resultados esperados, apresentando-se com nota 2 no índice

baseado em soma de “ranks” (Mulamba; Mock 1978), para as espécies *Eucalyptus urograndis* e *E. benthamii* e 3 para *E. urophylla* (Tabela 4).

Os autores Dragičević et al. (2015), observaram que a aplicação deste bioestimulante apresentou efeito positivo quanto ao teor de zinco analisado. Isto provavelmente ocorreu por conta do zinco já existente na formulação do produto, um micronutriente essencial para a iniciação da rizogênese, juntamente com nitrogênio, fósforo e manganês (Almeida 2012). Quando em combinação com o manganês influenciam o nível de auxinas endógenas (Brondani et al. 2012), justamente porque o zinco está relacionado à síntese de triptofano, precursor da auxina (Souza; Pereira 2007).

Já, em relação ao boro, outro elemento presente na formulação do produto comercial Algaren BZn<sup>®</sup>, apresenta efeito no enraizamento adventício, por ser requerido tanto durante a fase de iniciação das raízes, quanto durante o crescimento, por ser importante para a manutenção da divisão celular e, além disso, o boro parece estar relacionado com processos metabólicos, que influenciam diretamente no enraizamento, como os níveis de auxinas endógenas e a atividade de AIA oxidase. Sua deficiência causa mudanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que podem prejudicar a formação de raízes adventícias (Ono et al. 1994; Ono; Rodrigues 1996; Josten; Kutschera 1999; Trevizam et al. 2011; Almeida 2012). Por atuarem diretamente na regulação morfogênética, teores adequados de macro e micronutriente, especialmente nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e boro, são de extrema importância ao enraizamento (Assis; Teixeira 1998; Ramage; Williams 2002; Ansari et al. 2004).

Silva et al. (2018) observaram em brócolis que, ao longo do período de produção de mudas, o uso de nutrientes na irrigação das mudas acarretou em um aumento no número de folhas, altura das mudas além do incremento do peso de massa fresca e seca que, aumentaram quando comparado ao tratamento controle. Pereira et al. (2016) ressaltam que a produção de mudas de qualidade é essencial na obtenção do êxito para o estabelecimento destas em campo. Os autores observaram mudas de

*Moringa oleifera* Lam. de maior qualidade quando fertirrigadas, sendo o mesmo observado por Rocha et al. (2014) na produção de mudas de *Eucalyptus* spp.

Para a produção de culturas anuais e bianuais, o uso do Algaren BZn<sup>®</sup> vem sendo utilizado e mostrando efeitos significativos na otimização da rizogênese. No entanto, para este trabalho, o seu uso não apresentou resultados significativos para nenhuma das espécies testadas sendo, todavia, um tratamento superior para o enraizamento de eucaliptos quando comparado com T1 (tratamento controle) (Tabelas 1 e 4) e, com relação à incidência de calos, T3 também se mostrou superior à T1 (Figura 7). A aplicação do Algaren BZn<sup>®</sup> vem sendo indicada para as fases iniciais de cultivo para várias culturas, Chiminelli (2017) revela que o produto é responsável por estimular a produção de citocininas nas plantas, estimulando assim, o enraizamento. Como já verificado por Carvalho; Castro (2014), que observaram que o uso de extratos de alga aumentou a eficiência vegetal, principalmente no sistema radicular.

Ao utilizar o tratamento composto por ácido tânico + Algaren BZn<sup>®</sup> (T4), a hipótese foi que o ácido está envolvido na produção de auxinas e, o Algaren BZn<sup>®</sup> de citocininas, sendo, portanto, uma potencial alternativa para a indução da rizogênese em miniestacas de eucalipto. No entanto, este tratamento apresentou-se como o pior para praticamente todos os parâmetros avaliados (Tabelas 1 à 5). Além de elevada incidência de calos na base das miniestacas (Figura 8).

O Algaren BZn<sup>®</sup> trata-se de um composto comercial de extrato de alga *Ecklonia maxima* acrescido de boro e zinco. Na alimentação humana, a absorção do zinco é limitada quando em combinação com outras substâncias, como alguns antagonistas fitato, o oxalato, os taninos e os polifenóis, como discutido por Cruz; Soares (2011). Desta forma, acreditamos neste trabalho que o mesmo possa ter ocorrido na absorção vegetal deste micronutriente, tendo em vista que em plantas, está envolvido na síntese de auxinas.

No que se refere ao desenvolvimento vegetal, espera-se que tenha um adequado balanço entre auxina e citocininas, onde a concentração de auxina deve ser

sempre menor que a de citocinina e, a relação entre eles deve ser sempre menor que 1 (Brondani 2012). Quando o nível de auxina se eleva, ocorre a formação de raízes, o oposto favorece o desenvolvimento de brotos e caso as proporções entre esses dois reguladores de crescimento sejam semelhantes, acarretará na formação de calo (Krikorian 1995; Takahashi 2002). Brondani (2012) ressalta que a presença destas estruturas na região de conexão vascular é muito problemática, pois pode comprometer a estabilidade da planta em campo, bem como a funcionalidade da raiz que por ventura se forme em decorrência da diferenciação de células do calo.

As análises anatômicas realizadas evidenciaram que, independente da espécie e tratamento utilizado, houve desenvolvimento de tecido calogênico na região do córtex, como observado por Brondani (2012) que, da mesma forma, utilizou ácido indol butírico (AIB) para induzir a formação de raízes. Este tecido, provavelmente se desenvolve como uma forma de cicatrização da área de ruptura (Figura 10). Os autores Viana; Nunes; Machado Neto (2017) mostraram em seu estudo que a presença de calos nas plantas aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, de acordo com Batagin-Piotto (2013), é relacionada aos sistemas de defesa das plantas sendo, portanto, sua presença, uma forma de se constatar se houve algum tipo de stress à planta, bem como ataque de patógenos.

Além disso, estas análises permitem comprovar que, com exceção das miniestacas que formaram calo na base proximal, todas as raízes desenvolvidas neste experimento foram de origem direta apresentando conexão com o câmbio vascular (Figura 11). A conexão vascular da raiz adventícia é de extrema importância para garantir a qualidade da muda produzida via reprodução assexuada, muitas vezes quando se observa a presença de calo e, uma raiz oriunda deste calo, ou seja, de origem indireta, esta pode apresentar diversos problemas, principalmente tombamento quando levada ao campo (Li et al. 2009). Assim, fica evidente que apesar da formação de tecido calogênico na região do córtex, este surgiu externamente à origem radicular, formando um envoltório às raízes adventícias e nada tendo com sua origem, não interferindo, portanto, com a conexão vascular das

raízes, o que nos permite afirmar, que são raízes efetivas, muito parecidas com a raiz verdadeira ou típica, aquela obtida através de plantas com sementes (Almeida; Almeida 2014).

### 3.5 Conclusões

- ✓ O uso de ácido tânico na concentração de 250mg/L associado ao AIB otimiza o enraizamento de miniestacas de eucalipto nas três espécies estudadas (*Eucalyptus urograndis*; *E. benthamii* e *E. urophylla*);
- ✓ O uso de Algaren BZn<sup>®</sup> foi indiferente para enraizamento de miniestacas de eucalipto;
- ✓ Nenhum dos tratamentos aplicados causou alterações estruturais nas raízes adventícias desenvolvidas.

## REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF (2004) Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa: Editora UFV, 442 p.
- Almeida CV (1999) Atuação do ácido tânico na nodulação e no desenvolvimento de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. - Mimosoideae. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 91p.
- Almeida FD (2006) Propagação vegetativa de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia e miniestquia. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 86p.
- Almeida FD, Xavier A, Dias JMM, Paiva HN (2007) Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. Revista Árvore. 31(3):455-463
- Almeida LV (2012) Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 107p.
- Almeida M, Almeida CV, Graner EM, Brondani GE, Abreu-Tarazi MF (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. Plant Cell Report 31:1495–1515

- Almeida M, Almeida CV (2014) Morfologia da raiz de plantas com sementes. Piracicaba: ESALQ/USP, 71p. Disponível em: <http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/44838>
- Ansari TM, Ikram N, Najam-ul-Haq M, Fayyaz I, Fayyaz Q, Ghafoor I, Khalid N (2004) Essential trace metal (zinc, manganese, copper and iron) levels in plants of medicinal importance. *International Journal of Biological Sciences*. 4:95-99
- Araújo DK (2016) Extratos de *Ascophyllum nodosum* no tratamento de sementes de milho e soja: avaliações fisiológicas e moleculares. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 109p
- Assis TF, Teixeira SL (1998) Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, p.261-296.
- Azevedo GTOS, Souza AM, Azevedo GB, Cerqueira PHA (2015) Enraizamento de miniestacas de eucalipto com diferentes doses de polímero hidrorretentor incorporado ao substrato. *Sci. For.* 43(108):773-780
- Bartolini G, Tattini M (1986) Effects of phenolic acids and auxin on rooting *Olea europaea* L. cuttings. *Hortscience*. 21(2):2–262
- Batagin-Piotto KD (2013) Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 165p.
- Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. 27(4):325–349
- Borges SR, Xavier A, Oliveira LS, Lopes AP, Otoni WC (2011) Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* Rev. *Árv.* 35(2):173-182
- Brondani GE, Grossi F, Wendling I, Dutra FL, Araujo MA (2010) Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabage x *Eucalyptus dumii* Maiden. *Acta Scientiarum Agronomy*. 32(4):667-674
- Brondani GE (2012) Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*. 2012. 184p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 186p.
- Brondani GE, Baccarin FJB, Wit Ondas HW, Stape JL, Gonçalves NA, Almeida M (2012) Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. *J. For. Res.* 23(4):583-592
- Carvalho MEA, Castro PRC (2014) Extratos de algas e suas aplicações na agricultura. *Série Produtor Rural* - nº 56, 60p.
- Castro-Silva MA; Rörig LR, Lamb LH, Heck CA, Decusati OG (2004) Microrganismos associados ao tratamento de águas de asbatemento com coagulante vegetal (tanato quaternário de amônio) - I. microrganismos filamentosos. *Rev. Estudo Bio.* 26(54):21-27

- Chiminelli LO (2017) Resultados em campo do Algaren. Disponível em: <<http://agroatacado.com.br/novidades/resultados-em-campo-do-algaren/>>. Acesso em: 26/07/2018.
- Costa MM, Di Mauro AO, Unêda-Trevisoli SH, Arriel NHC, Bárbaro IM, Muniz FRS (2004) Ganho genético por diferentes critérios de seleção em populações segregantes de soja. *Pesq. agropec. bras.* 39(11):1095-1102
- Curir P, Vansumere CF, Termini A, Barthe P, Marchesini A, Dolci M (1990) Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiol.* 92:1148-1153
- Cruz CD, Carneiro PCS (2008) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2.ed. Viçosa: UFV.
- Cruz JBF; Soares HF (2011) Uma revisão sobre o zinco. *Ensaio e Ciência Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde.* 15(1):208-222
- Davis TD, Haissig BE, Sankhla N (1988) Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides Press. 2:174-84
- De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A (1999) Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology.* 27:445-459
- Dragičević V, Nikolić B, Waisi H, Stojiljković M, Đurović S, Spasojević I, Perić V (2015) Alterations in mineral nutrients in soybean grain induced by organo-mineral foliar fertilizers. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.* 2(12):1-8
- Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae.* 196:3-14
- Echer FR, Dominato JC, Creste JE (2009) Absorção de nutrientes e distribuição da massa fresca e seca entre órgãos de batata-doce. *Horticultura Brasileira* 27:176-182.
- Ertani A, Sambo P, Nicoletto C, Santagata S, Schiavon M, Nardi S (2015) The use of organic biostimulants in hot pepper plants to help low input sustainable agriculture. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.* 2(1):1-10
- Fogaça CM (2003) Papel da auxina e seus moduladores na rizogênese de *Eucalyptus globulus* Labill e *Eucalyptus saligna* Smith. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 69p.
- Fisher DB (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie.* 16:92-96
- Gomes GLGC (2011) Alterações metabólicas de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu/SP, 104p.
- Grones P, Chen X, Simon S, Kaufmann WA, De Rycke R, Nodzyński T, Zažímalová E, Friml J (2015) Auxin-binding pocket of ABP1 is crucial for its gain-of-function cellular and developmental roles. *J. Exp. Bot.* 66(16):5055-5065.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. *Paleontological electronica.* 4:1-9

- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (2002) Plant Propagation: Principles and Practices. 7th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 880p
- Haslam E (1993) Shikimic acid: metabolism and metabolites. Chinchester: John Wiley, 1993. 392p.
- Josten P, Kutschera U (1999) The micronutrient boron causes the development of adventitious roots in sunflower cuttings. *Annals of Botany Company*. 84:337-342
- Karnovsky MJA (1965) A Formaldehyde-glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for use in Electron Microscopy. *Journal of Cell Biology*. 27(2):137-138
- Kauffman GL, Kneivel DP, Watschke TL (2007) Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Sci*. 47:261–267
- Kirkby EA, Römheld V (2007) Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. *Encarte do Informações Agronômicas N° 118*, 24p.
- Krikorian AD (1995) Hormones in tissue culture and micropropagation. In: *Plant Hormones*, 2ª Ed., Davies PJ (Ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.774-796
- Lajús CR, Sobral LS, Belotti A, Savaris MA, Lampert S, Santos SRF, Kunst T (2007) Ácido Indolbutírico no Enraizamento de Estacas Lenhosas de Figueira (*Ficus carica* L.). *Rev. Bras. Bioc*. 5(2):1107-1109
- Leone GF (2013) Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto (2013). Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 100p.
- Li SW, Xue L, Xu S, Feng H, An L (2009) Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *The Botanical Review* 75(2):230-247
- Malavolta E (2006) Manual de nutrição mineral de plantas. Ceres, São Paulo, 638 p.
- Mello JCP, Santos SC (2001) Taninos. In: Simões CM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmagnosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Ed.URGRS/Ed. UFSC
- Monteiro JM, Albuquerque UO, Araújo EL (2005) Taninos: uma abordagem da química e ecologia. *Química Nova*. 28(5):892-896
- Mulamba NN, Mock JJ (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egyptian Journal of Genetic and Cytology*, Giza, 7:40-51
- Ono EO, Barros AS, Rodrigues JD, Pinho SZ (1994) Enraizamento de estacas de *Platanus acerifolia*, tratadas com auxinas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 29(9):1373-1380
- Ono EO, Rodrigues JD (1996) Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares. Jaboticabal: FUNEP, 83 p.
- Pereira KTO, Oliveira FA, Cavalcante ALG, Dantas RP, Mychelle Oliveira KT, Costa JPBM (2016) Qualidade de mudas de moringa sob diferentes níveis de nutrientes aplicados via fertirrigação. *Pesq. flor. bras*. 36(88):497-504

- Queiroz CRAA, Morais SAL, Nascimento EA (2002) Caracterização dos taninos da Aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). Rev. Árvore. 26(4):485-492
- Ramage CM, Williams RR (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. In Vitro Cellular and Development Biology. 38:115-124
- Rocha JHT, Backes C, Borelli K, Rey M (2015) Produtividade do minijardim e qualidade de miniestacas de um clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (I-224) em função de doses de nitrogênio. Ciênc. Flor. 25(2):273-279
- Rocha SA, Garcia GO, Lougon MS, Cecílio RA, Caldeira MVW (2014) Crescimento e nutrição foliar de mudas de *Eucalyptus* sp. irrigadas com diferentes qualidades de água. Revista de Ciências Agrárias. 37(2):141-151
- Santos LDT, Graça RN, Alfenas AC, Ferreira FA, Ferreira LR, Oda S (2007) Glyphosate sobre a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto. Planta Daninha. 25(1):139-147
- Silva PNL, Souza LG, Redigolo MVN, Cardoso AII (2018) Produção de brócolis em função das doses de nitrogênio e potássio na fertirrigação das mudas. Revista de Agricultura Neotropical. 5(4):61-67
- Souza AV, Pereira AMS (2007) Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 9(4):103-117
- Staden JV, Beckett RP, Rijkenberg MJ (1995) Effect of seaweed concentrate on the growth of the seedlings of three species of *Eucalyptus*. S. Afr. J. Bot. 61(4):169-172
- Taiz L, Zeiger E (2009) Fisiologia vegetal. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 819 p.
- Takahashi EK (2002) Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 156p.
- Teixeira DHL, Oliveira MSP, Gonçalves FMA, Nunes JAR (2012) Índices de seleção no aprimoramento simultâneo dos componentes da produção de frutos em açaizeiro. Pesq. agropec. bras. 47(2):237-243
- Thimann KV, Went FW (1934) On the chemical nature of the root-forming hormone of plants. Proc Kon Akad Wetensch 37:456-458
- Trevizam R, Brondani GE, Nery FU, Gonçalves AN, Almeida M (2011) Caracterização morfológica de calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake sob concentrações de boro e cálcio. Cerne. 17(2):215-222
- Viana RS; Nunes RCA; Machado Neto NB (2017) Fitorreguladores na formação de calos em segmentos foliares de gerbera (*Gerbera jamesonii*). Rev. Mirante. 10(5a):42-54
- Voet D, Voet JG (2006) Bioquímica. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1596 p.
- Wendling I, Xavier A, Gomes JM, Pires IE, Andrade HB (2000) Minicuttings and microcuttings rooting of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden clones as affected by IBA. Rev. Árv. 24(2):187-192
- Wendling I, Xavier A (2005) Indolbutiric acid and serial minicutting technique on rooting and vigor of *Eucalyptus grandis* clone minicuttings. Rev. Árv. 29(6):921-93

#### 4 ACLIMATIZAÇÃO DE MICROESTACAS DE *Eucalyptus urograndis* ALONGADAS *IN VITRO* COM BIOESTIMULANTES

##### Resumo

A técnica *in vitro* é extremamente interessante e vantajosa por induzir a reversão à juvenilidade de clones micropropagados, pois além da produção maciça de mudas uniformes, as condições de cultivo favorecem também, o enraizamento de espécies e/ou clones que apresentam considerável recalcitrância a este evento morfogênico. Neste sentido, é de extrema importância a busca pela otimização nas etapas e, conseqüentemente, nas mudas geradas a partir da técnica de micropropagação. Desta forma, no presente trabalho foram testados os bioestimulantes ácido tânico (250mg/L) e Algaren BZn<sup>®</sup>(1ml/L) em meios de cultura para alongamento de brotações de *Eucalyptus urograndis*, sendo estes utilizados de forma isolada e/ou em combinação, tendo como controle os tratamentos convencionais. Após 90 dias de cultivo *in vitro*, brotações alongadas foram coletadas e aclimatizadas até a formação de mudas. Todas as fases foram avaliadas e seus dados analisados por meio de índice de somatória de ranks, a partir do qual se constatou que o tratamento com ácido tânico foi o mais satisfatório e o tratamento composto pela união dos bioestimulantes (ácido tânico e Algaren BZn<sup>®</sup>) e com Algaren BZn<sup>®</sup> isolado apresentaram resultados inferiores ao tratamento controle. Apesar das diferenças observadas quanto aos parâmetros morfofisiológicos, análises histológicas evidenciaram que todos os tratamentos desenvolveram mudas aptas para serem conduzidos ao campo, formando sistema radicular com origem cambial direta e com conexão vascular.

Palavras-chave: Enraizamento; Micropropagação; Brotações alongadas; Ácido tânico; Extrato de alga

##### Abstract

The *in vitro* technique is extremely interesting and advantageous for inducing the reversion to youthfulness of micropropagated clones, since in addition to the uniform seedlings massive production, its cultivation conditions also favor the rooting of species and/or clones that present considerable recalcitrance to this morphogenic event. On this way, the search for optimization in micropropagation stages is extremely important and, consequently, in the seedlings generated from this technique. So, on this work the biostimulants tannic acid (250mg/L) and Algaren BZn<sup>®</sup> (1ml/L) were applied in culture media to elongate *E. urograndis* shoots, which were used in isolated and/or in combination, having as control the conventional treatments. After 90 days at *in vitro* culture, elongated shoots were cutted and acclimatized until the plant formation. All phases were evaluated and their data

analyzed by ranks summation index, from which it was verified that the treatment with tannic acid was the most satisfactory and the treatment composed by biostimulants union (tannic acid and Algaren BZn<sup>®</sup>) and Algaren BZn<sup>®</sup> isolated had presented inferior results to the control treatment. In spite of the observed differences in the morphophysiological parameters, histological analyzes showed that all treatments developed plants suitable for going to the field, with a root system with cambial direct origin and vascular connection.

Keywords: Rooting; Micropropagation; Shoots elongation; Tannic acid; Seaweed extract

#### 4.1 Introdução

O setor florestal tem investido consideráveis somas em pesquisas visando o melhoramento da eucaliptocultura, em função da expressiva plasticidade do gênero que, inegavelmente vem resultando no aumento significativo da produtividade e, conseqüentemente, no uso de seus produtos e subprodutos, maximizando não apenas a economia, como também, a preservação de matas nativas, excessivamente exploradas nos setores madeireiro e energético. A multiplicação de *Eucalyptus* é realizada essencialmente via assexuada por meio de técnicas de mini e microestaquia, que proporcionam a obtenção maciça de clones de genótipos superiores adaptados aos mais diferentes ambientes com a expectativa de garantir a homogeneidade dos produtos, como qualidade da madeira para a indústria de papel e celulose, produção de energia, tolerância ao estresse e resistência a doenças (Zanuncio et al. 1998; Baccarin et al. 2015). Todavia, essas técnicas de propagação constantemente são afetadas pela recalcitrância do gênero à rizogênese, justificando as inúmeras pesquisas referentes à busca pela solução deste problema. Acreditamos que, a constante recalcitrância ao enraizamento possa estar relacionada com o envelhecimento ontogênico das matrizes selecionadas, sendo assim, o uso da técnica de cultura *in vitro*, como citado por Baccarin (2012) e Leone (2013), proporciona o rejuvenescimento dos propágulos, além da alta taxa de multiplicação que acelera os programas de propagação clonal do eucalipto. De forma geral, a micropropagação é dividida em fases, descritas por Grattapaglia e Machado (1998), como *Fase 0*,

relacionada ao acondicionamento das plantas matrizes, as quais devem ser mantidas com irrigação e fertilização constantes, garantindo o desenvolvimento de brotações saudáveis que serão utilizadas como fontes de explantes para introdução *in vitro* na *Fase 1*, que se refere à introdução e estabelecimento *in vitro* dos explantes, os quais devem se desenvolver livres de oxidação e contaminação, resultando em plantas saudáveis. Já, na *Fase 2*, multiplicação das brotações desenvolvidas a partir dos explantes (*Fase 1*), é importante que se obtenha o maior número de brotos no menor tempo possível para obtenção de material para a *Fase 3*, a qual refere-se ao alongamento das brotações obtidas na fase anterior. Esta fase é muito importante para conduzir os propágulos ao enraizamento, facilitando assim, o manejo tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. Já, a última fase da micropropagação, principalmente para o cultivo de eucalipto, a *Fase 4*, cujo objetivo é induzir o enraizamento das brotações e aclimatização, na qual as brotações alongadas *in vitro* (microestacas) são induzidas ao enraizamento em substrato onde se espera a formação de raízes funcionais. Para tanto, é essencial que a *Fase 3*, de alongamento das brotações *in vitro*, seja bem estabelecida, tendo em vista que esta depende não apenas do tipo, mas também das concentrações de reguladores de crescimento (George; Hall; De Klerk 2008; Wendling; Dutra 2010). E, para este fim, destaca-se a auxina, principalmente o ácido indolacético (AIA), e o ácido indolbutírico (AIB), os quais são amplamente utilizados à indução de raízes adventícias nos sistemas de propagação assexuada *in vivo* e *in vitro* (Ludwig-Müller 2000; Marchioro, 2005; Li et al. 2009). O uso de composto fenólico associado ao AIA é bastante comum e os resultados são significativamente satisfatórios (Curir et al. 1990; Prado 2014). Destaca-se que a aplicação de composto fenólico associados ou não, ao zinco e ao boro, podem atuar efetivamente na síntese do AIA (ácido indolacético), inibindo a RNase que hidrolisa o RNA e reduzindo o nitrato a nitrito (Malavolta; Vitti; Oliveira 1997) e a aplicação de ácido tânico, um composto fenólico, nos vegetais apresenta-se como um potencial indutor de raízes e desenvolvimento do sistema aéreo (Lima 1998), além disso, tendo em vista a participação do boro na divisão celular, acarretando o aumento no tamanho das

células, transporte de carboidratos da folha para outros órgãos (Malavolta 1980) agindo portanto, como agente morfogênico, já descrito por Spurr (1957). Atualmente, um produto que vem sendo amplamente utilizado para essa função são os extratos de algas, devido às substâncias neles encontradas, vêm sendo empregado como fertilizantes e bioestimulantes vegetais, considerando que estes, podem afetar positivamente inúmeras etapas do desenvolvimento das plantas, sendo a principal delas o desenvolvimento inicial (melhoria na germinação de sementes, estabelecimento de plântulas e aumento e melhoria do sistema radicular), refletindo no estabelecimento em campo e na produtividade vegetal (Carvalho; Castro 2014; Araújo 2016). Em função dessas informações e pautados no pressuposto que bioestimulantes otimizam processos morfogênicos, principalmente rizogênese, o objetivo deste trabalho foi buscar alternativas para o enraizamento de microestacas de eucalipto e sua posterior aclimatização. Para tanto, utilizamos dois bioestimulantes: ácido tânico e Algaren BZn<sup>®</sup> (extrato da alga *Ecklonia maxima* suplementado com os micronutrientes boro e zinco) adicionados no meio de cultura para alongamento de brotações de *Eucalyptus urograndis*.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Localização da área experimental**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, Piracicaba/SP, situado entre as coordenadas geográficas 22°42’ de latitude sul e 47°38’ de longitude oeste de Greenwich, e a 138 km de distância da Capital do Estado de São Paulo.

### **4.2.2 Material vegetal**

Para obtenção de explantes para introdução *in vitro*, mudas de *Eucalyptus urograndis* foram plantadas em areia média e mantidas em casa de sombra filtrando a

luz solar em 70%, para constituição de minijardim clonal, sob constante fertirrigação (Figura 1). No período entre 30 e 45 dias da quebra da dominância apical das minicepas, as novas brotações (gemas axilares) foram coletadas e conduzidas para o laboratório dando sequência às etapas de micropropagação. Nos quinze dias que antecederam a introdução *in vitro*, foi realizado tratamento profilático com as matrizes, aplicando-se fungicida Orthocid® (2,4 g/L) acrescido de Tween® 20% (3 gotas/L), visando a minimização de contaminações *in vitro*.

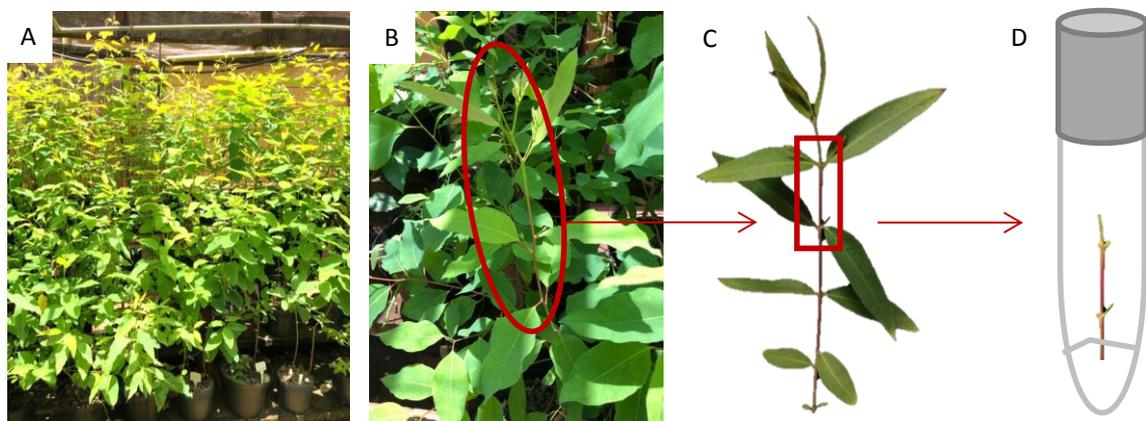


Figura 1 – Plantas matrizes de eucalipto em casa de sombra. A) Matrizes de *Eucalyptus urograndis*; B) Escolha de brotações para estabelecimento *in vitro*; C) Preparo de explantes; D) Introdução *in vitro*

#### 4.2.2.1 Introdução *in vitro*

Para a introdução *in vitro*, as brotações coletadas das matrizes de eucaliptos tiveram seus limbos foliares removidos (Figura 1), mantendo-se os pecíolos com aproximadamente 5 mm de comprimento e segmentada em explantes (segmentos nodais) constituídos por duas gemas axilares com 15-20 mm de comprimento, sempre cortados em bisel. Em laboratório, os explantes foram lavados em água corrente por 30 minutos e imersas em solução de fungicida Orthocide® (2,4g/litro) acrescido de 2 gotas de Tween® 20% por 15 minutos, seguido de três enxagues em água deionizada autoclavada. A seguir, os explantes foram imersos em solução de NaClO a 30% (v/v) acrescido de 2 gotas de Tween 20% pelo período de 10 minutos e novamente enxaguados com água estéril. Após a desinfestação, os explantes foram

introduzidos em meio de cultura MS (Murashige; Skoog 1962) suplementado com 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose; 0,8 gL<sup>-1</sup> de Polivinilpirrolidona (PVP) e 4,5 gL<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5.8 (±1) com HCl (1M) e NaOH (1M). Os segmentos nodais foram mantidos neste meio de cultivo por 30 dias e as brotações que se mantiveram assintomáticas e com desenvolvimento adequado foram transferidas para novo meio de cultura. Durante todo o processo de micropropagação as plantas foram mantidas em sala de crescimento com controle de temperatura, fotoperíodo e luminosidade, sendo respectivamente: 25±2°C, 16:8 horas (luz/escuro) e (40μmol/m<sup>2</sup>/s).

#### 4.2.2.2 Multiplicação *in vitro*

Após o período de 30 dias, as brotações desenvolvidas nos explantes foram transferidas para meio de cultura WPM (Lloyd; McCown 1981) para multiplicação, suplementado com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mgL<sup>-1</sup> de ANA (Brondani et al. 2012), além de 0,8 gL<sup>-1</sup> de Polivinilpirrolidona (PVP), 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose e 4,5 gL<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5.8 (±1) com HCl (1M) e NaOH (1M) (Figura 2).



Figura 2 – Microcepas de *Eucalyptus urograndis* estabelecida em meio de cultura para multiplicação das brotações.

#### 4.2.2.3 Alongamento *in vitro*

##### 4.2.2.3.1 Testes preliminares

Após o período de 120 dias, correspondente a quatro subcultivos, as microcepas de *Eucalyptus* spp estabelecidas na fase de multiplicação, foram transferidas para

meio de cultura WPM líquido, suplementado com  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose;  $0,8 \text{ gL}^{-1}$  de Polivinilpirrolidona (PVP),  $0,05 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA. As microcepas foram sustentadas em pérolas de vidro autoclavada (Figura 3).

Testes preliminares foram realizados para definir as concentrações mais relevantes de ácido tânico e Algaren BZn<sup>®</sup> aplicadas no experimento com as microestacas (estacas obtidas *in vitro*). Os resultados definiram as quantidades: 250mg/L de ácido tânico e 1ml/L de Algaren BZn<sup>®</sup>.



Figura 3 – Microcepas de *Eucalyptus urograndis* em meio de cultura líquido para alongamento e sustentadas em pérolas de vidro autoclavadas

#### 4.2.2.3.2 Tratamentos

A terapia com agentes bioestimulantes foi realizada em meio de cultura WPM líquido para alongamento, acrescido de ácido tânico e/ou extrato de alga *Ecklonia maxima* (Algaren BZn<sup>®</sup>) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição dos tratamentos terapêuticos com agentes bioestimulantes

Tratamentos	Grupos	Classificação	Concentração (µl/L)
T1	Testemunha	---	---
T2	Ácido tânico	Composto fenólico	250
T3	Algaren BZn®	Extrato de <i>Ecklonia máxima</i> acrescido de B e Zn	1.000
T4	Ácido tânico + Algaren BZn®	Composto fenólico + Extrato de <i>Ecklonia máxima</i> acrescido de B e Zn	250 e 1.000

Os meios de cultura acrescido dos bioestimulantes foram renovados 3 vezes ao longo de 90 dias, ou seja, a cada 30 dias, totalizando 3 subcultivos.

#### 4.2.2.3.3 Microestacas *ex vitro*

Decorridos 90 dias (três subcultivos), as brotações alongadas de *Eucalyptus urograndis* (microestacas) com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram coletadas e transferidas para bandejas para plantio de hortaliças em substrato autoclavado composto por vermiculita média e Basaplant florestal® (2:1, v/v). As bandejas foram acondicionadas em recipientes plásticos (miniestufa) (Figura 4), mantidas por 30 dias em sala de crescimento.

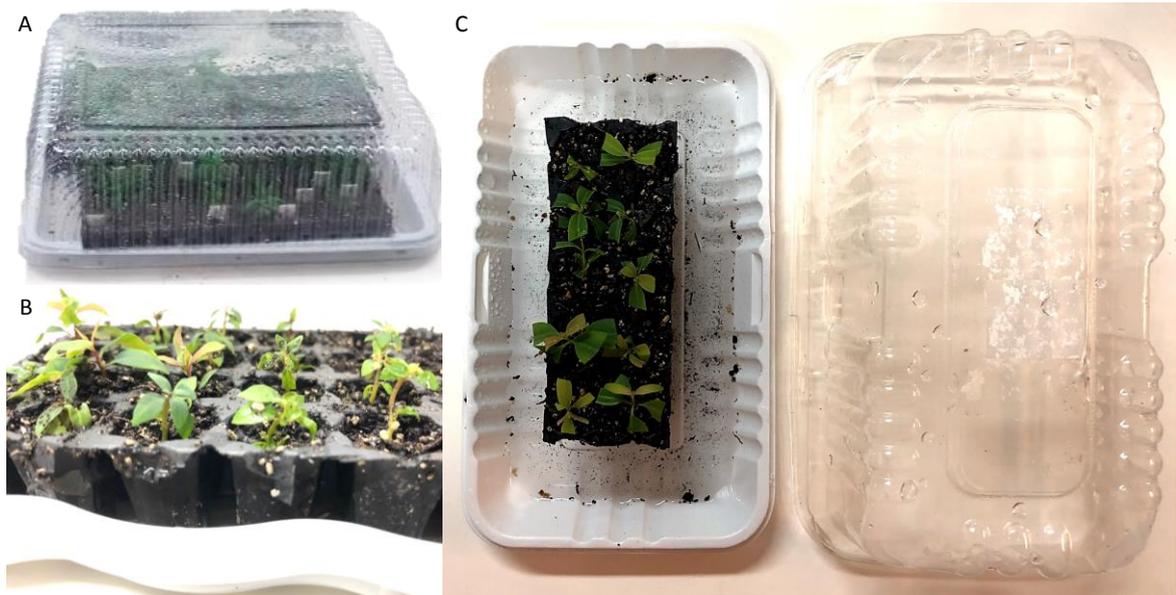


Figura 4 – Miniestufa com brotações de *Eucalyptus urograndis* coletadas da fase de alongamento em *in vitro*. A) Visão geral da miniestufa; B e C) Visão geral de como as microestacas ficam acomodadas no sistema de miniestufa.

Após 30 dias, as brotações alongadas, agora caracterizadas como microestacas, foram transferidas para tubetes com 12 cm de comprimento por 3,5 cm de diâmetro com capacidade total de 120 cm<sup>3</sup>, preenchido com substrato Basaplant<sup>®</sup> e vermiculita média (2:1). As plantas foram transferidas para casa de sombra filtrando a luz solar em 70%.

Os tubetes envoltos em saco plástico assemelhando-se a uma estufa, foram imersos em recipientes contendo 50ml de solução nutritiva (Tabela 2), onde permaneceram por 15 dias. Decorrido esse período os sacos plásticos foram perfurados e as plantas mantidas nas mesmas condições por mais 15 dias e em seguida, transferidas para bandejas de tubetes, ainda em casa de sombra, por mais 15 dias. Ao final deste período, as plantas foram transferidas para pleno sol, completando 45 dias do ciclo de rustificação total das mudas.

Tabela 2 – Composição da solução nutritiva aplicada nas microestacas de *Eucalyptus urograndis*

Componente	Fórmula	g/200L
Nitrato de Cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	152
Sulfato de Amônia	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	45
MAP	fosfato monoamônico	22
Cloreto de Potássio	KCl	80
Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub>	75
Tenso Ferro	FeEDDHMA-6%Fe	4,4
Sulfato de Manganês	MnSO <sub>4</sub>	0,9
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,55
Sulfato de Zinco	ZnSO <sub>4</sub>	0,06
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub>	0,05
Molibdato de Sódio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,01

#### 4.2.3 Parâmetros analisados

As microcepas (*in vitro*) e as microestacas (*ex vitro*) de *Eucalyptus urograndis* foram avaliadas semanalmente para obtenção de dados dos seguintes parâmetros:

- ✓ Microcepas: vigor, comprimento e altura das microcepas e número de brotações alongadas;
- ✓ Microestacas em fase de miniestufa: vigor, número de brotos e folhas, altura do sistema aéreo e presença de raízes;
- ✓ Microestacas em fase de tubetes em casa de sombra: vigor, número de brotos e folhas e altura do sistema aéreo;
- ✓ Microestacas em fase de tubetes a pleno sol: vigor, número de brotos e folhas; altura do sistema aéreo; incremento do peso de massa fresca e seca dos sistemas aéreo e radicular.

Vale lembrar que os tratamentos foram aplicados somente na fase de alongamento *in vitro* das microcepas de *Eucalyptus urograndis*. Nas fases subsequentes, nenhum tratamento foi aplicado, as análises ocorreram apenas para verificação do efeito dos tratamentos nas microestacas.

#### 4.2.4 Análises histológicas

Para verificar possíveis alterações anatômicas nas microestacas de *Eucalyptus urograndis* oriundas de alongamento *in vitro* com bioestimulantes, bem como analisar a origem celular das raízes obtidas na base da microestaca, foram realizadas secções transversais de material fresco confeccionadas a mão livre com auxílio de lâminas de aço, utilizando-se para tanto, três microestacas de cada tratamento.

Os cortes obtidos foram submetidos à dupla coloração com o reagente ácido periódico de Schiff (PAS) e naftol blue-black, com metodologia adaptada de Fisher (1968) e Almeida et al. (2012), além de Sudan Black B (Pearse 1968).

Após a coloração, os materiais foram montados em lâminas semi-permanentes com glicerina 50% e as imagens foram obtidas em microscópio de luz (Zeiss-Jenemed 2) acoplado a um sistema de captura de imagens (Samsung, SDC-313) com as respectivas escalas na mesma proporção.

#### 4.2.5 Delineamento experimental e coleta dos dados

O delineamento experimental da fase de alongamento *in vitro* das microcepas de *E. urograndis* foi constituído de 4 tratamentos x 5 parcelas. Sendo as parcelas representadas por frascos de vidro contendo 4 microcepas em cada. Os dados dos parâmetros morfofisiológicos das microcepas e microestacas foram analisados com o auxílio do índice baseado de soma dos “ranks”, de acordo com Mulamba; Mock (1978), o qual hierarquiza os parâmetros por atribuição de valores absolutos mais elevados àqueles de melhor desempenho. Por fim, os valores obtidos foram somados, para obtenção dos “ranks”, que assinala a classificação de cada indivíduo analisado (Cruz; Carneiro 2008).

A Figura 5 representa um esquema resumido do procedimento metodológico utilizado no presente trabalho.

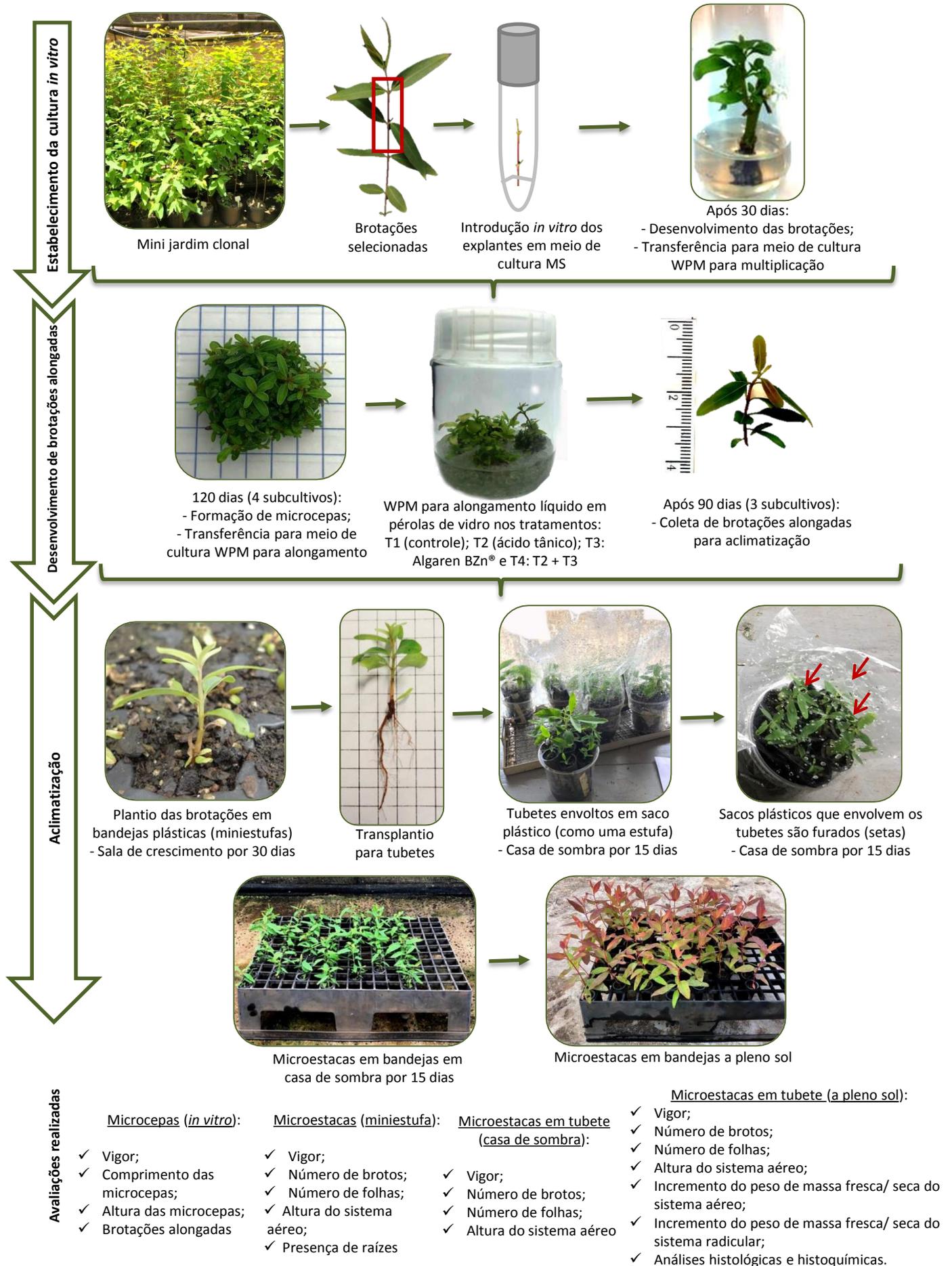


Figura 5 - Esquema representativo da metodologia realizada para execução do trabalho com microcepas e microestacas de *Eucalyptus urograndis*

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Testes preliminares e Tratamentos

Os resultados preliminares evidenciaram que concentrações de ácido tânico abaixo de 250mg/L não apresentaram resultados satisfatórios enquanto que as concentrações acima de 250mg ocasionaram elevada oxidação das microcepas. O mesmo ocorreu quando a concentração de Algaren BZn<sup>®</sup> foi aplicada acima das recomendações do fabricante (Figura 6).

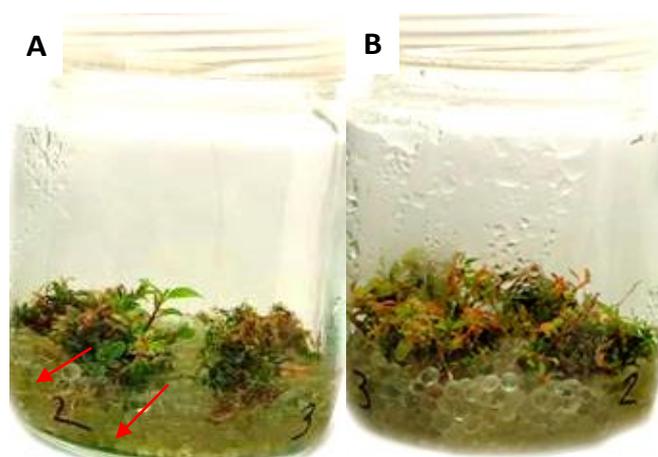


Figura 6 – Microcepas de *Eucalyptus urograndis* com oxidação durante testes preliminares para determinação das concentrações de cada bioestimulante. Algaren BZn<sup>®</sup> (A); ácido tânico (B). Seta indica excessivo desenvolvimento de algas

Assim, após o estabelecimento das concentrações de cada bioestimulantes a ser utilizado, 250mg/L para ácido tânico e 1ml/L para Algaren BZn<sup>®</sup>, que foram utilizados nos tratamentos: T1: controle; T2: ácido tânico; T3: Algaren BZn<sup>®</sup> e T4: T2 + T3, as microcepas foram mantidas nestas condições durante o período de três subcultivos, 90 dias, com avaliações semanais ao longo deste período.

Seus resultados foram ponderados por meio de atribuições de notas, gerando um índice de somatórias de acordo com a classificação estabelecida por Mulamba; Mock (1978).

As microcepas foram mantidas por três subcultivos em meio de cultura WPM líquido para indução de alongamento das brotações, com 0,05 mgL<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ANA. Além disso, bioestimulantes foram acrescentados compondo os

respectivos tratamentos (Tabela 1). Para verificar a atuação de cada um destes tratamentos em microcepas de *Eucalyptus*, avaliações semanais foram realizadas. A Tabela 3 representa estes dados e, para melhor visualização dos tratamentos foi utilizada uma escala de cores, representando valores inferiores aos superiores, portanto, do melhor ao pior tratamento.

Tabela 3 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urograndis*. T1: controle; T2: 250mg/L de Ácido Tânico; T3: 1ml/L de Algaren BZn® e T4: T2 + T3

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros				
	V	CM	AM	NBA	Índice
T1	2	2	1	2	7
T2	3	1	2	1	7
T3	1	3	3	3	10
T4	4	4	4	4	16

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; CM: comprimento das microcepas; AM: altura das microcepas e NBA: número de brotações alongadas.

De acordo com a Tabela 4, ao longo dos três subcultivos nestas condições e 12 semanas de avaliações, as microcepas mostraram-se mais responsivas no tratamento 1 (controle, isento de bioestimulantes), ou seja, foram mantidas nas mesmas condições as quais vinham sendo cultivadas, porém, desta vez em meio de cultura líquido. Este tratamento apresentou melhores resultados quanto às características morfológicas das microcepas, no entanto, estes dados foram ofuscados pelo empate observado de T1 com T2 (ácido tânico), que apresentou médias superiores com relação ao comprimento das microcepas e número de brotações alongadas. Estes dois tratamentos (T1 e T2) apresentaram-se como os melhores, exceção feita apenas para o parâmetro vigor, cujo melhor resultado foi observado no tratamento 3 (Algaren BZn®) e nos demais parâmetros deste tratamento, observou-se notas inferiores (nota 3) quando comparado com os demais tratamentos.

Já o tratamento composto pela combinação de T2 e T3, foi o tratamento mais insatisfatório, apresentando as piores notas para todos os parâmetros avaliados, tais

como: vigor; comprimento das microcepas; altura das microcepas e número de brotações alongadas (Tabela 3).

#### 4.3.2. Microestacas *ex vitro*

Após a fase de alongamento *in vitro* das brotações, estas foram coletadas e transferidas para miniestufa, iniciando assim, a fase de aclimatização das microestacas. Esta primeira fase do processo de aclimatização foi realizada no período de 30 dias, em sala de crescimento com controlada (temperatura, fotoperíodo e luminosidade, respectivamente:  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 16:8 horas (luz/escuro) e  $40\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

Para verificar as diferenças entre os tratamentos, avaliações semanais foram realizadas e os dados gerados são demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em microestacas de *Eucalyptus urograndis* em miniestufa. T1: controle; T2: 250mg/L de Ácido Tânico; T3: 1ml/L de Algaren BZn® e T4: T2 + T3

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros					
	V	NB	NF	AM	PR	Índice
T1	1	2	2	2	2	9
T2	2	1	1	1	1	6
T3	3	3	3	3	3	15
T4	4	4	4	4	4	20

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NB: número de brotos; NF: número de folhas; AM: altura das microestacas e PR: presença de raiz.

Na Tabela 4 demonstrou-se que, T2 foi o melhor tratamento para as microestacas de *Eucalyptus* spp obtidas de alongamento *in vitro* com tratamentos com bioestimulantes, seguido de T1; T3 e T4. Além disso, o tratamento 2 (ácido tânico), com exceção do vigor das microestacas, apresentou médias superiores para todos os parâmetros analisados, tais como número de brotos; número de folhas; altura da microestaca e presença de raízes observadas para fora da bandeja onde foram plantadas, como demonstrado na Figura 7.

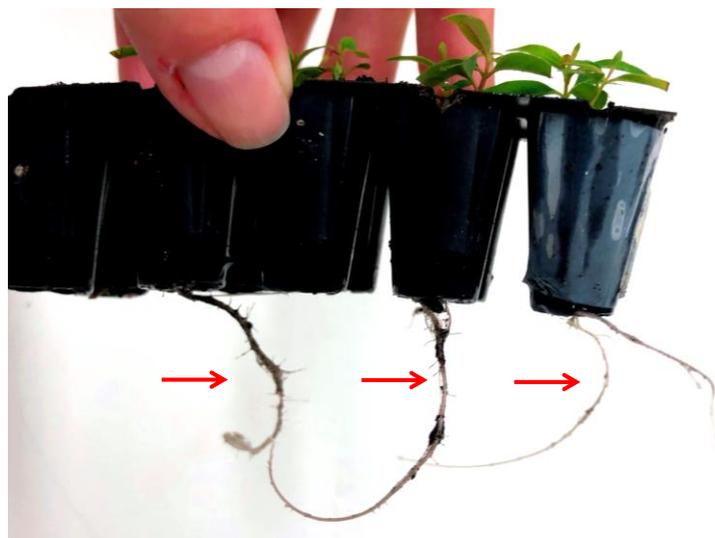


Figura 7- Microestacas de *Eucalyptus urograndis* plantadas em miniestufa. Setas indicam a presença de raízes.

Ainda em relação à Tabela 4, observa-se que T4 (ácido tânico + Algaren BZn®), apresentou médias inferiores para todos os parâmetros avaliados.

Decorridos 30 dias, as microestacas foram transplantadas em tubetes e passaram a ser mantidas em casa de sombra. Por 15 dias os tubetes ficaram envoltos em saco plástico e imersos em solução nutritiva (Tabela 2), em seguida, os sacos plásticos foram perfurados e, mantiveram nestas condições por mais 15 dias. Após este período, os tubetes foram transferidos para bandejas por mais 15 dias, ainda em casa de sombra. Completando, assim, um período total de 45 dias de rustificação das microestacas em casa de sombra.

A Tabela 5 mostra as médias geradas a partir de avaliações semanais ao longo destes 45 dias em que as microestacas foram mantidas em casa de sombra.

Tabela 5 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em microestacas de *Eucalyptus urograndis* em aclimatização em casa de sombra. T1: controle; T2: 250mg/L de Ácido Tânico; T3: 1ml/L de Algaren BZn® e T4: T2 + T3

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros				
	V	NB	NF	AM	Índice
T1	1	3	2	3	9
T2	2	2	1	1	6
T3	3	1	3	2	9
T4	4	4	4	4	16

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NB: número de brotos; NF: número de folhas e AM: altura das microestacas.

A Tabela 5 demonstra que, assim como observado nas Tabelas 3 e 4, respectivamente os dados de microcepas em fase de alongamento *in vitro* e de microestacas de *E. urograndis* plantadas em miniestufa, T2 foi o melhor tratamento, apresentando a melhor nota (1), para os parâmetros de número de folhas e altura das microestacas, para os demais parâmetros, vigor e número de brotos, este tratamento apresentou a segunda melhor nota (2).

Na sequência do tratamento T2, temos T1, que apresentou nota 1 para vigor, nota 2 para número de folhas e nota 3 para número de brotos e altura das microestacas. Empatado com T1 no índice baseado de soma dos “ranks”, esteve T3, que apresentou nota 1 para número de broto, nota 2 para altura das microestacas e nota 3 para vigor e numero de folhas.

E por fim, o tratamento T4 (ácido tânico + Algaren BZn®), como pode ser observado na Tabela 5, apresentou médias inferiores para todos os parâmetros analisados, assim como observado nas Tabelas 4 e 5, sendo, portanto, o pior tratamento de acordo com no índice baseado de soma dos “ranks”.

Ao final dos 45 dias em casa de sombra, as mudas foram transferidas a pleno sol por mais 15 dias, onde se encerrou o experimento, considerando-se o fato de que esta fase foi destrutiva, por fornecer dados de incremento do peso de massa fresca e

seca do sistema aéreo e radicular, além da altura deles. A Tabela 6 apresenta dados das avaliações semanais nestas condições.

Tabela 6 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em microestacas de *Eucalyptus urograndis* em aclimatização a pleno sol. T1: controle; T2: 250mg/L de Ácido Tânico; T3: 1ml/L de Algaren BZn® e T4: T2 + T3

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros									Índice
	V	NB	NF	MF-SA	MS-SA	ASA	MF-SR	MS-SR	ASR	
T1	1	1	2	2	3	2	2	3	3	19
T2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	11
T3	3	3	3	3	2	3	3	2	2	24
T4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	36

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NB: número de brotos; NF: número de folhas; MF-SA: incremento do peso de massa fresca do sistema aéreo; MS-SA: incremento do peso de massa seca do sistema aéreo; ASA: altura do sistema aéreo; MF-SR: incremento do peso de massa fresca do sistema radicular; MS-SR: incremento do peso de massa seca do sistema radicular e ASR: altura do sistema radicular.

A Tabela 6 demonstra que, assim como observado nas Tabelas 3, 4 e 5, nota-se que, seguindo o padrão observado nas fases anteriores, T2 foi o melhor tratamento, inclusive para os novos parâmetros analisados, tais como: incrementos do peso de massa fresca e seca dos sistemas aéreo e radicular, além da altura dos sistemas aéreo e radicular. O tratamento com ácido tânico (T2), apresentou a melhor nota (1), para todos os parâmetros analisados, exceto vigor e número de brotos que foi observada a nota 1 em T1, o segundo melhor tratamento observado, que apresentou nota 2 para os parâmetros número de folhas, incremento de massa fresca do sistema aéreo, altura do sistema aéreo, incremento de massa fresca do sistema radicular. Nos parâmetros incremento de massa seca do sistema aéreo e incremento de massa seca do sistema radicular e a altura do sistema radicular, apresentou nota 3.

O terceiro tratamento observado no índice baseado de soma dos “ranks” foi T3 (Algaren BZn®), que não apresentou nota 1 para nenhum parâmetro analisado. Para incremento de massa seca dos sistemas aéreo e radicular e altura do sistema radicular, apresentou nota 2. Para os demais parâmetros, neste tratamento, tiveram nota 3.

E por fim, como observado nas demais Tabelas (4, 5 e 6), T4 (ácido tânico + Algaren BZn<sup>®</sup>), foi o pior tratamento empregado, apresentando a pior nota (4), para todos os parâmetros analisados.

### 4.3.3 Análises histológicas

As análises histológicas foram realizadas com corte de material fresco (sem emblocar) da região proximal das microestacas de *E. urograndis* para verificar a origem celular das raízes formadas. Os cortes foram corados com dupla coloração do reagente ácido periódico de Schiff (PAS) em associação com naftol blue-black, além de Sudan Black B. Não foi observada nenhuma distinção histológica entre os tratamentos. Desta forma, a Figura 7 representa o padrão observado em todas as microestacas utilizadas como amostra para esta análise.

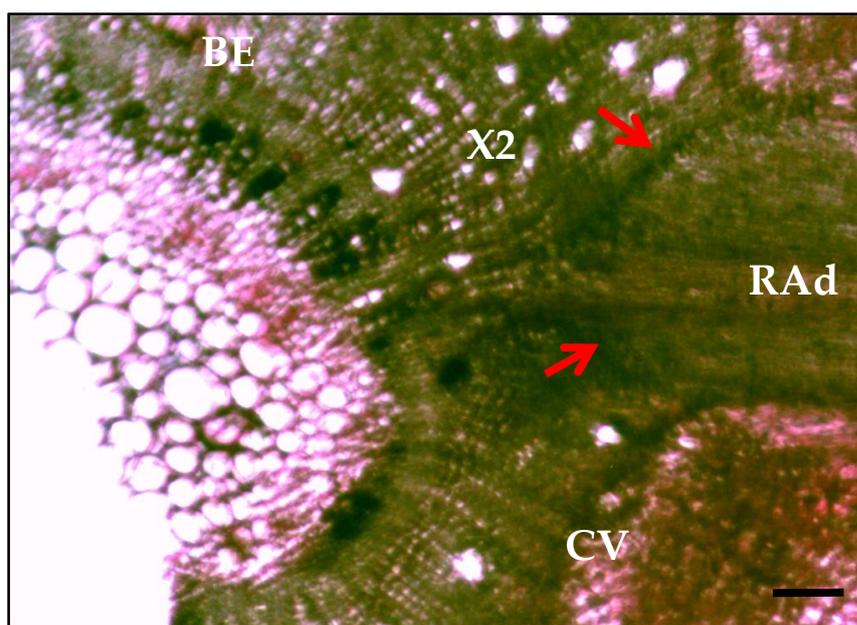


Figura 7 – Secções transversais de corte de material fresco da região proximal da base de microestacas de *Eucalyptus urograndis*. Setas: conexão vascular entre os sistemas radicular e aéreo; BE: corte transversal na base da microestaca; RAd: corte long da raiz adventícia; X2: xilema secundário; CV: câmbio vascular

## 4.4 Discussão

Microcepas de *Eucalyptus urograndis* foram cultivadas *in vitro*, em meio de cultura WPM para alongamento das brotações, fase importantíssima da técnica de micropropagação por garantir a formação de propágulos saudáveis para

aclimatização e enraizamento, facilitando assim, o manejo vegetal tanto *in vitro* quanto *ex vitro* (Grattapaglia; Machado 1998). De acordo com Dutra; Wendling; Brondani (2009) o ideal é que as fases de multiplicação e alongamento das brotações sejam realizadas concomitantemente, no entanto, existem culturas que necessitam de meio de cultura próprio para esta última fase, regulada por balanços hormonais adequados entre auxina e citocinina testados para cada fase do cultivo *in vitro*.

Tendo em vista que o meio de cultura sólido é considerado o ideal para micropropagação de espécies do gênero (Correia et al. 1995) e, que neste trabalho foi testada a aplicação de bioestimulantes em meio de cultura líquido para o alongamento de brotações de *E. urograndis*, foi necessária a busca por alternativas para evitar problemas no metabolismo vegetal relacionados ao uso de meios de cultura semi-sólidos ou líquidos (Vasconcelos et al. 2012), tais como vitrificação (ou hiperidricidade) de folhas e gemas, uma desordem morfofisiológica e bioquímica decorrente do acúmulo anormal de água no interior das células e tecidos, uma provável resposta à difusão passiva da água para dentro dos tecidos que comumente ocorre quando as plantas ficam imersas no meio de cultura (Kevers et al. 2004; Vasconcelos et al. 2012).

Desta forma, optou-se pelo uso de pérolas de vidro autoclavada que permite o contato com o meio de cultura apenas na base das microcepas (termo designado aos “tufos” de brotações de eucaliptos *in vitro*) (Figura 3), como observado em meios de cultura preparados com agentes solidificantes. Embora não se encontre na literatura a utilização de pérolas de vidro no cultivo *in vitro* de plantas, o seu uso autoclavado é comum em estudos microbiológicos com linhagens bacterianas e fúngicas (Carretto et al. 2007; Galdiano Júnior 2009).

Brondani (2012) frisa em seu trabalho a importância da busca incessante por melhorias nas etapas da micropropagação de *Eucalyptus*, bem como a redução dos seus custos, estabelecendo assim protocolos que maximizem a produção e que possam ser difundidos para outras espécies e até mesmo gêneros.

Neste contexto, o presente trabalho buscou a utilização de bioestimulantes, produtos com substâncias naturais e/ou sintéticas, comumente aplicados em sementes, plantas e solos podendo alterar processos vitais e estruturais dos vegetais (Ávila et al. 2008). Castro e Vieira (2001) revelam que os bioestimulantes quando aplicados nos vegetais podem atuar de maneira similar aos grupos de hormônios vegetais conhecidos, tendo influência, portanto, no desenvolvimento das plantas.

Os bioestimulantes utilizados foram: o ácido tânico, um composto fenólico e o Algaren BZn®, produto comercial extraído de algas *Ecklonia maxima* acrescido dos micronutrientes boro e zinco, estes foram aplicados de forma isolada e/ou em combinação em meio de cultura líquido para alongamento de brotações de eucalipto, além de tratamento controle, isento de bioestimulantes.

Microcepas de *E. urograndis* submetidas aos tratamentos supracitados ao longo de três subcultivos que, para eucaliptos são realizados em média a cada 30 dias, para renovação do meio de cultura (Baccarin 2012; Brondani 2012; Leone 2013) e, no caso deste experimento, dos bioestimulantes.

Os resultados destas avaliações foram ponderados por meio de atribuições de notas, gerando um índice de somatórias de acordo com a classificação estabelecida por Mulamba; Mock (1978), no qual os autores determinaram que, quanto menor o valor do índice, constituído pela somatória dos parâmetros em cada tratamento e, não somente no aspecto geral, como determinado por outras análises estatísticas. Tendo em vista que esse índice é obtido após o ordenamento das espécies analisadas quanto aos parâmetros avaliados no sentido desejado (notas superiores às inferiores), e posterior somatória das suas classificações (Teixeira et al. 2012), como demonstrado nas Tabelas de 3 a 6.

Em todas as fases deste experimento, o T2 (ácido tânico) foi o melhor tratamento empregado, ficando sempre à frente do tratamento 1 (controle), sendo que este último caracteriza, portanto, os resultados comumente encontrados em alongamento *in vitro* de *Eucalyptus* spp e sua subsequente aclimatização. O enraizamento *ex vitro* realizado simultaneamente à aclimatização das microestacas

demonstrou ser uma prática de grande êxito no processo de micropropagação dos materiais genéticos em estudo. Acrescenta-se que o enraizamento *ex vitro* representa redução de custos na micropropagação pela eliminação de uma etapa de cultivo *in vitro*, representado pelo enraizamento. Esta já se tornou uma prática comum e há tempos empregada (Baccarin 2012; Brondani 2012; Brondani et al. 2012; Batagin-Piotto 2013).

O fato de o tratamento 2 ter sido o melhor para todas as fases, é um resultado que pode ser considerado esperado, tendo em vista que o ácido tânico, um tanino, faz parte do grande grupo dos compostos fenólicos produzido no metabolismo secundário das plantas que, de acordo com Peres (2004), nem sempre é necessário ao ciclo de vida vegetal, no entanto, desempenha um importante papel em suas interações com o meio ambiente. É um composto importante para o crescimento e reprodução vegetal e os dados observados nas Tabelas de 3 a 6 corroboram com Lima (1998), que observou que o uso de compostos fenólicos no cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis* maximizou o desenvolvimento vegetal, além de Curir et al. (1990) que observou o mesmo para *Eucalyptus gunni*.

Além disso, a importância destes produtos do metabolismo secundário das plantas durante o processo de enraizamento foi constatada em trabalhos clássicos, como as pesquisas desenvolvidas por Bartolini & Tattini (1986) e Curir et al. (1990), os quais evidenciaram que a associação de auxinas com fenóis favorece este evento morfogênico. Estes produtos podem alterar os mecanismos oxidativos nos vegetais, como espécies reativas de oxigênio, que são geradas como subprodutos de diversos processos metabólicos, além de aumentar a ação de auxinas no enraizamento por inibir o sistema AIA-oxidase, prevenindo a degradação de AIA (Pandey; Pathak, 1981; Hammatt, 1993; Gajewska; Skłodowska, 2007).

Já o tratamento 3, composto por Algaren BZn<sup>®</sup>, veio na sequência de T1 e T2 quando se observa o índice de soma de classificação, sendo que este tratamento apresentou média superior apenas com relação ao vigor das microcepas, o mesmo observado por Aremu et al. (2015), ao isolar extratos de *Ecklonia maxima* e verificar

sua atuação no desenvolvimento de *Eucomis autumnalis*. Em todas as fases do experimento, este tratamento não foi satisfatório às plantas, apresentando-se com nota 3 no índice baseado em soma de “ranks” (Mulamba; Mock 1978).

O tratamento com extrato de alga se mostrou inferior para o crescimento e desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus urograndis*, corroborando com dados demonstrados por Santos et al. (2013), no qual o tratamento com extrato de alga se mostrou inferior ao tratamento controle para dados de taxas de crescimento (Tabelas 3 a 6), e incremento dos pesos de massa fresca e seca dos sistemas aéreos e radiculares (Tabela 6), demonstrando, portanto, que esta não é uma alternativa viável para melhoria de cultivo vegetal.

O mesmo se aplica ao tratamento 4 que, para este trabalho foi classificado como o pior em todos os parâmetros para todas as fases analisadas (alongamento de brotações *in vitro*; aclimatização em fase de miniestufa; casa de sombra e rustificação a pleno sol) (Tabelas 3 a 6), corroborando novamente com dados de Santos et al. (2013), que observou que a somatória de tratamento com extrato de alga com outro bioestimulantes se apresentou extremamente desfavorável para o cultivo vegetal, sendo inclusive um tratamento pior que a testemunha.

Apesar de se observar diferenças no desenvolvimento das microestacas nas fases avaliadas ao longo dos tratamentos (Tabelas 3 a 6), ao realizar análises histológicas na base das microestacas, observou-se que, em todos os tratamentos, as raízes formadas tiveram origem direta com conexão vascular, garantindo assim, que são raízes funcionais (Figura 7). Desta forma, conclui-se que, apesar de os tratamentos terem apresentado diferenças morfofisiológicas nas microestacas, todos foram capazes de desenvolver raízes funcionais, sem o risco de tombamento quando levada ao campo (Li et al. 2009) com potencial, portanto, de se tornar futuras plantas matrizes.

#### 4.5 CONCLUSÕES

- ✓ A aplicação de ácido tânico em meio de cultura para alongamento de brotações de eucalipto garante melhores resultados em todas as fases de formação da muda;
- ✓ Algaren BZn® apresentou resultados inferiores ao tratamento controle;
- ✓ O uso combinado de ácido tânico com Algaren BZn® foi insatisfatório para produção de mudas micropropagadas;
- ✓ Nenhum dos tratamentos aplicados causou alterações estruturais nas raízes adventícias desenvolvidas.

#### REFERÊNCIAS

- Almeida M, Almeida CV, Graner EM, Brondani GE, Abreu-Tarazi MF (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Report* 31:1495–1515
- Araújo DK (2016) Extratos de *Ascophyllum nodosum* no tratamento de sementes de milho e soja: avaliações fisiológicas e moleculares. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 109p.
- Aremu AO, Masondo NA, Rengasamy KRR, Amoo SO, Gruz J, Bíba O, Subrtova M, Pencik A, Novák O, Dolezal K, Van Staden J (2015) Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. *Planta*. 241:1313–1324
- Ávila MR, Braccin AL, Scapim CA, Albrecht LP, Tonin TA, Stülp M (2008) Bioregulator application, agronomic efficiency, and quality of soybean seeds. *Scientia Agricola*. 65(6):604-612
- Baccarin FJB (2012) Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 78p.

- Baccarin, FJB, Brondani GE, Almeida LV, Vieira IG, Oliveira LS, Almeida M (2015) Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. *New For.* 46(4):465-483
- Bartolini G, Tattini M (1986) Effects of phenolic acids and auxin on rooting *Olea europaea* L. cuttings. *Hortscience.* 21:2-262
- Batagin-Piotto KD (2013) Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 165p.
- Brondani GE (2012) Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*. 2012. 184p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo.
- Brondani GE, Ondas HWW, Baccarin FJB, Gonçalves AN, Almeida M (2012) Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.* 48(5):35-48
- Carretto CFP, Navas EAFA, Paradella TC, Oliveira LD, Junqueira JC, JORGE AOC (2007) Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. *Revista de Odontologia da UNESP.* 36(3):281-286
- Carvalho MEA, Castro PRC (2014) Extratos de algas e suas aplicações na agricultura. *Série Produtor Rural - nº 56, 60p.*
- Castro PRC, Vieira EL (2001) Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. *Revista Brasileira de Sementes.* 23(2):222-228
- Correia D, Gonçalves AN, Couto HYZ, Ribeiro MC (1995) Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. *IPEF, Piracicaba, n. 48/49, p. 107-116*
- Cruz CD, Carneiro PCS (2008) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2.ed. Viçosa: UFV.

- Curir P, Vansumere CF, Termini A, Barthe P, Marchesini A, Dolci M (1990) Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiology*, v.92, 1148-1153
- Dutra LF, Wendling I, Brondani GE (2009) A micropropagação de eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*. 58:49-59
- Fisher DB (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*. 16:92-96
- Gajewska E, Skłodowska M (2007) Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals*. 20:27-36
- Galdiano Júnior RF (2009) Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, Jaboticabal/SP, 83p.
- George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2008) *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht:Springer, 2008. 501p.
- Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. 1:183-260.
- Hammatt N (1993) Micropropagation of fastigate bird cherry (*Prunus padus* L.) and adventitious shoot formation from leaves. *Journal of horticultural Science*. 68(6):975-981
- Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommes J, Gaspar T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: at typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 77:181-191
- Leone GF (2013) Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 101p.
- Li SW, Xue L, Xu S, Feng H, Na L (2009) Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Bot Rev*. 75:230-247

- Lima CCM (1998) Uso de aditivos e cofatores na capacidade de enraizamento de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 95p.
- Lloyd G, McCown B (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagators Society. 30:421-427
- Ludwig-Müller J (2000) Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regul.* 32:219-230
- Malavolta E (1980) Elementos de nutrição mineral de plantas. Piracicaba: Agronômica Ceres, 251p.
- Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo, 319 p.
- Marchioro LET (2005) Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 74 p.
- Mulamba NN, Mock JJ (1978) Improvement of yield potential of the *Eto Blanco maize* (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egyptian Journal of Genetic and Cytology*, Giza, 7:40-51
- Murashige T, Skoog F (1962) A review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum.* 15:473-493
- Pandey D, Pathak RK (1981) Effect of Rootstocks, IBA and Phenolic Compounds on the Rooting of Apple Cuttings. *Propagation of Horticulture.* 13:105-110
- Pearse AGE (1968) Histochemistry. Theoretical and Applied. Boston: Little, Brown. 759p.
- Peres LEP (2004) Metabolismo Secundário. Apostila da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 26p.
- Prado DZ (2014) Enraizamento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* pela ação de peróxido de hidrogênio, quercetina e ácido indolbutírico. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica Vegetal) - Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu/SP, 113p.

- Santos VM, Melo AV, Cardoso DP, Gonçalves AH, Varanda MAF e Taubinger M (2013) Uso de bioestimulantes no crescimento de plantas de *Zea mays* L. Revista Brasileira de Milho e Sorgo. 12(3):307-318
- Spurr AR (1957) The effect of boron on cell walls structure in celery. American Journal of Botany, 44:637-650
- Teixeira DHL, Oliveira MSP, Gonçalves FMA, Nunes JAR (2012) Índices de seleção no aprimoramento simultâneo dos componentes da produção de frutos em açaizeiro. Pesq. agropec. bras. 47(2):237-243
- Vasconcelos AGV, Tomas LF, Camara TR, Willadino L (2012) Hiperidricidade: uma desordem metabólica Cienc. Rural. 42(5):837-844
- Wendling I, Dutra LF (2010) Produção de mudas de eucalipto. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 184p.
- Zanuncio JC, Mezzomo JA, Guedes RNC, Oliveira AC (1998) Influence of strips of native vegetation on Lepidoptera associated with *Eucalyptus cloeziana* in Brazil. For. Ecol. Manag. 108:85-90

## 5 BIOESTIMULANTES NA ACLIMATIZAÇÃO DE MICROESTACAS DE *Eucalyptus urophylla*

### Resumo

O uso de bioestimulantes na aclimatização de microestacas de *Eucalyptus urophylla* apresenta-se como promissor no desenvolvimento das plantas, garantindo melhor rizogênese e subsequente desempenho no campo. Para tanto, o presente trabalho aplicou os bioestimulantes ácido tânico (250mg/L) e Algaren BZn<sup>®</sup> (1ml/L) isolados e/ou em combinação, além do tratamento controle, na base das microestacas de eucaliptos em fase de aclimatização (T1: controle; T2: ácido tânico; T3: Algaren BZn<sup>®</sup> e T4: T2 +T3) e nas bandejas (base das miniestufas) (T5: controle; T6: ácido tânico; T7: Algaren BZn<sup>®</sup> e T8: T6 +T7). As microestacas foram mantidas por 30 dias nestas condições e posteriormente foram submetidas às subseqüentes fases da aclimatização, em ambiente de casa de sombra e pleno sol, nas quais não foram mais aplicados os tratamentos. Todas as fases foram avaliadas e os resultados, analisados com o índice de somatória de ranks, a partir do qual se constatou que os tratamentos com Algaren BZn<sup>®</sup> (T3 e T7) foram os mais satisfatórios e, com ácido tânico (T2 e T4) os resultados mostraram-se inferiores ao controle (T1) quando aplicados na base das microestacas. Já, quando aplicado nas bandejas das miniestufas, o tratamento com ácido tânico (T6) e o controle (T5), apresentaram-se inferiores àquele formado pela somatória dos dois bioestimulantes (T8). Apesar das diferenças observadas entre os tratamentos, as análises anatômicas evidenciaram que todos os tratamentos tiveram rizogênese direta a partir de células cambiais e apresentaram conexão vascular entre as raízes adventícias e a parte aérea, comprovando a eficiência do sistema radicular originado.

Palavras-chave: Enraizamento; Eucalipto; Micropropagação; Ácido tânico; Algaren BZn<sup>®</sup>

### Abstract

The use of biostimulants in *Eucalyptus urophylla* microcuttings acclimatization might be promising in the plants development, guaranteeing a better rhizogenesis and subsequent performance in the field. Thus, the present study applied the biostimulants tannic acid (250mg/L) and Algaren BZn<sup>®</sup> (1ml/L) isolated and/or in combination, besides the control treatment at the base of eucalyptus microcuttings in acclimatization (T1: control; T2: tannic acid; T3: Algaren BZn<sup>®</sup> and T4: T2 +T3) and at the ministuff base (T5: control; T6: tannic acid; T7: Algaren BZn<sup>®</sup> and T8: T6 +T7). The microcuttings were kept for 30 days on these conditions and afterwards, they were submitted to the subsequent acclimatization phases, at shade house and full sun, in which treatments were no longer applied. All phases were evaluated and their

results were analyzed with the ranks summation index, which showed that the treatments with Algaren BZn® (T3 and T7) were the most satisfactory and the treatments with tannic acid (T2 and T4) presented inferior results than the control treatment (T1) when applied at the base of the microcuttings. When applied at the ministuff base, the treatments with tannic acid (T6) and control (T5) were inferior to that formed by the sum of the two biostimulants (T8). Despite these differences between treatments, anatomical analyzes showed that all treatments had direct rhizogenesis from cambial cells and vascular connection between the adventitious roots and the aerial part, proving the efficiency of the originated root system.

Keywords: Rooting; Eucalyptus; Micropropagation; Tannic acid; Algaren BZn®

## 5.1 Introdução

A propagação clonal vem sendo cada vez mais utilizada por meio de técnicas *in vitro*, não apenas em função do rejuvenescimento resultante do processo da cultura de células, tecidos e/ou órgãos, como também para minimizar problemas frequentes de enraizamento relacionados à recalcitrância desse evento fisiológico em inúmeros clones de espécies florestais, com ênfase ao gênero *Eucalyptus* (Hartmann; Kester; Davies 1990; De Klerk; Van Der Kieken; De Jong 1999; Baccarin 2012; Costa et al. 2013). Empresas florestais certificam-se, com o uso de protocolos de clonagem *in vivo* e/ou *in vitro*, da obtenção de florestas constituídas por genótipos selecionados a partir de programas clássicos de melhoramento, o que lhes garante a superioridade e homogeneidade de seus produtos (Baccarin 2012; IBÁ 2017). O elevado grau de rejuvenescimento que a técnica de micropropagação promove em materiais adultos, amplia com o subsequente uso da microestaquia a qual, por meio de várias etapas, atua com maior velocidade na iniciação e crescimento radicular depois de todo o preparo com o propágulo *in vitro*, garantindo assim, a aclimatização do genótipo micropropagado até que este, esteja apto para ser levado ao campo, resultando na otimização da produção de florestas plantadas (Higashi; Silveira; Gonçalves 2005). Ao se comparar taxas de enraizamento entre mini e microestacas, as mudas oriundas do processo *in vitro* demonstram ser mais efetivas na reversão à recalcitrância deste evento morfogênico (Dutra; Wendling; Brondani 2009; Oliveira et al. 2012; Correia et

al. 2015). Tendo em vista que a chave para o sucesso na propagação de plantas é o desenvolvimento de raízes adventícias, a recalcitrância dos clones é o principal fator limitante na produção de novos indivíduos (Almeida; Almeida 2014; de Almeida et al. 2015). No que tange o enraizamento, normalmente são aplicadas auxinas, hormônios relacionados à divisão e alongamento de células meristemáticas, diferenciação da raiz primária, bem como, mobilização das reservas nutricionais para o local da rizogênese (Blakesley; Weston; Hall 1991). Todavia, muitas vezes, nem mesmo com a aplicação do AIB (ácido indolbutírico) obtêm-se sucesso nos processos de estaquia, e em função disto, o uso de produtos com potencial de atuação como reguladores de crescimento ou que possam sintetizá-los, vem sendo amplamente utilizado. Alguns desses produtos, denominados bioestimulantes, são constituídos por extratos de algas, entre elas a *Ecklonia maxima*, associada com boro e zinco, disponível no comércio como Algaren BZn<sup>®</sup>, cuja aplicação vem sendo destacada em função do potencial estimulante ao enraizamento (Aremu et al. 2015). Além dos extratos de algas, os taninos, produtos do metabolismo secundário das plantas, têm demonstrado forte atuação na proteção das auxinas contra oxidação e regulando os teores deste regulador de crescimento nos tecidos vegetais e, de acordo com Fogaça (2003), o ácido tânico pode ser utilizado na fase de indução das raízes. Desta forma, considerando as dificuldades que espécies e/ou clones de eucalipto apresentam à rizogênese, o objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos para aclimatização de microestacas de *Eucalyptus* em associação com dois bioestimulantes, ácido tânico e Algaren BZn<sup>®</sup>, aplicados em miniestufa a fim de garantir uma melhor formação do sistema radicular e seu subsequente desempenho no campo, considerando ainda que, a realização da etapa de enraizamento de microestacas em condições *ex vitro*, além de melhorar a qualidade do sistema radicular, minimiza os custos da técnica *in vitro*, os quais são consideravelmente onerosos.

## 5.2 Material e métodos

### 5.2.1 Localização da área experimental

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, situado entre as coordenadas geográficas 22°42’ de latitude sul e 47°38’ de longitude oeste de Greenwich, e a 138 km de distância da Capital do Estado de São Paulo.

### 5.2.2 Constituição do minijardim clonal para obtenção de explantes

O minijardim clonal (Figura 1) de matrizes de *Eucalyptus urophylla* foi conduzido em casa de sombra (70%), os quais receberam tratamentos profiláticos, antecedendo a retirada de explantes utilizados no processo *in vitro*, por meio de constante fertilização e aplicação de fungicidas. Para assegurar a supressão da dominância apical, realizou-se a quebra do ápice caulinar das matrizes, proporcionando o desenvolvimento das gemas axilares e, conseqüentemente, a emissão de novas brotações, que foram coletadas com aproximadamente 2 cm de comprimento, mantendo, ao menos, uma gema lateral por segmento, estabelecendo assim, os explantes que, após assepsia, foram introduzido em meio de cultura.



Figura 1: Casa de sombra com minijardim clonal de *Eucalyptus urophylla*. Mudas em processo de aclimação (A); Matrizes já desenvolvidas (B); Quebra do ápice caulinar para emissão de novas brotações (C); Gemas axilares desenvolvidas a partir da quebra do ápice caulinar (D); Brotações coletadas para confecção dos explantes (E)

### 5.2.3 Estabelecimento e Multiplicação *in vitro* das brotações

Após a confecção dos explantes, estes passaram por fases subsequentes para desinfestação, tais como: lavagem dos explantes em água corrente por 10 minutos, seguida de imersão em solução de fungicida Orthocide® (2,4g/L) adicionado de 3 gotas de Tween 20 por 15 minutos e três enxágues com água deionizada autoclavada, finalizando com 10 minutos de hipoclorito de sódio 30% acrescido de 3 gotas de Tween 20 que foram enxaguados por três vezes com água deionizada autoclavada, agora em câmara de fluxo. Após a desinfestação dos explantes, estes foram introduzidos em meio de cultura de cultura MS (Murashige; Skoog 1962), isento de reguladores de crescimento adicionado de 30 g/L de sacarose e isento de reguladores

de crescimento. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8. Durante 30 dias, os explantes foram mantidos neste meio de cultura, para estabelecimento *in vitro*.

As brotações assintomáticas procedentes da fase de introdução e estabelecimento *in vitro* foram transferidas para meio de cultura WPM (Lloyd; McCown 1981) como recomendado por Brondani et al. (2012), suplementado com reguladores de crescimento para multiplicação (BAP: 0,5mg/L e ANA: 0,05mg/L), 0,8 g/L de PVP (polivinilpirrolidona) e 30,0 g/L de sacarose. O pH da solução foi ajustado para 5,8 e as brotações permaneceram nesse meio de cultura por cinco subcultivos de 28 dias cada. Após esse período (140 dias) as microcepas resultantes do processo de multiplicação foram transferidas para meio de cultura WPM, agora suplementado com reguladores de crescimento para alongamento das brotações (0,05 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de ANA). As microcepas foram mantidas nesse meio por mais 84 dias, finalizando três subcultivos de 28 dias cada.

As plantas foram mantidas em sala de crescimento com controle de temperatura, fotoperíodo e luminosidade, sendo respectivamente:  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 16:8 horas (luz/escuro) e  $(40\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s})$ .

#### **5.2.4 Aclimatização das microestacas**

Brotações alongadas com aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram transferidas para o ambiente *ex vitro*, e mantidas em bandejas de semeadura completadas com substrato Basaplant® e vermiculita (2:1) autoclavado por 30 minutos a pressão de 1 atm e  $120^{\circ}\text{C}$  e armazenadas em embalagens plásticas com tampa transparente, formando um sistema de “*miniestufa*” (Figura 2).



Figura 2: Miniestufas com microestacas de *Eucalyptus urophylla*, para aclimatização em sala de crescimento.

Testes preliminares foram realizados para definir as concentrações mais relevantes de ácido tânico e Algaren BZn<sup>®</sup> aplicadas no experimento com as microestacas (estacas obtidas *in vitro*). Os resultados definiram as quantidades: 250mg/L de ácido tânico e 1ml/L de Algaren BZn<sup>®</sup>.

Após a acomodação das microestacas nas miniestufas, os tratamentos foram aplicados com micropipetas de duas maneiras: 1) diretamente na base das microestacas e 2) nas bandejas (na base das miniestufas), determinando assim, dois experimentos com 8 tratamentos (Figura 3, Tabela 1). As microestacas foram mantidas em miniestufas de forma semelhante a um vaso de Leonard (Vincent 1970).

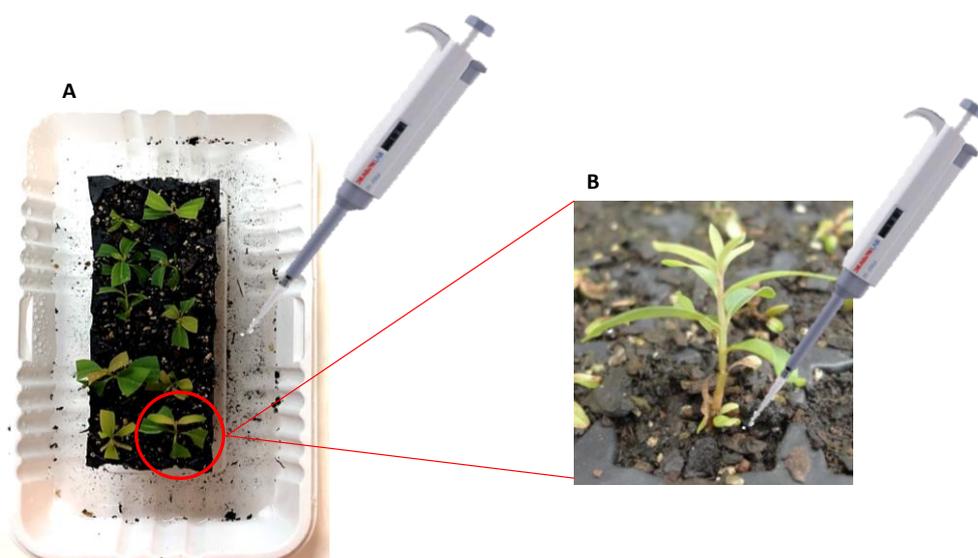


Figura 3: Aclimatização microestacas de *Eucalyptus urophylla* com bioestimulantes. Bioestimulantes aplicados nas bandejas das miniestufas (A); Bioestimulantes aplicados na base das microestacas (B)

Tabela 1 – Bioestimulantes aplicados em microestacas de *Eucalyptus urophylla*

Tratamento	Bioestimulante	Aplicação	
		Base das microestacas	Base das miniestufas
<b>1</b>	Isento (água destilada autoclavada)	+	-
<b>2</b>	ácido tânico (250mg/L)	+	-
<b>3</b>	Algaren BZn® (1ml/L)	+	-
<b>4</b>	ácido tânico (250mg/L) + Algaren BZn® (1ml/L)	+	-
<b>5</b>	Isento (água destilada autoclavada)	-	+
<b>6</b>	ácido tânico (250mg/L)	-	+
<b>7</b>	Algaren BZn® (1ml/L)	-	+
<b>8</b>	ácido tânico (250mg/L) + Algaren BZn® (1ml/L)	-	+

As microestacas foram mantidas nos referidos tratamentos (Tabela 1) pelo período de 30 dias em sala de crescimento nas mesmas condições do cultivo *in vitro*. Após a finalização desta fase, os bioestimulantes não foram mais aplicados, porém, continuamos acompanhando o desenvolvimento das microestacas nas fases subsequentes para verificação do efeito dos tratamentos nas mudas formadas.

Após os trinta dias, todas as microestacas foram transplantadas em tubetes com 12 cm comprimento x 3,5 cm diâmetro e capacidade total de 30 gramas de substrato Basaplant® associado à vermiculita média (2:1). As plantas ficaram envoltas em saco plástico assemelhando-se a uma estufa e os tubetes foram imersos em recipientes contendo 50ml de solução nutritiva (Tabela 2), mantidas em casa de sombra (70%) por quinze dias. Decorrido esse período, os sacos plásticos foram perfurados e as plantas mantidas nas mesmas condições por mais 15 dias sendo então, transferidas para bandejas de tubetes, ainda em casa de sombra por mais 15 dias, completando então, os 45 dias necessários para o ciclo de rustificação das microestacas. Ao final deste período, as plantas foram transferidas para pleno sol.

Tabela 2 – Composição da solução nutritiva aplicada nas microestacas de *Eucalyptus urograndis*

Componente	Fórmula	g/200L
Nitrato de Cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	152
Sulfato de Amônia	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	45
MAP	fosfato monoamônico	22
Cloreto de Potássio	KCl	80
Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub>	75
Tenso Ferro	FeEDDHMA-6%Fe	4,4
Sulfato de Manganês	MnSO <sub>4</sub>	0,9
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,55
Sulfato de Zinco	ZnSO <sub>4</sub>	0,06
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub>	0,05
Molibdato de Sódio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,01

### 5.2.5 Parâmetros analisados

Os tratamentos com bioestimulantes foram aplicados em microestacas de *Eucalyptus urophylla* em fase de aclimatização e estas foram avaliadas semanalmente para obtenção de dados dos seguintes parâmetros:

- ✓ Microestacas em fase de miniestufa: vigor, número de brotos e folhas, altura das microestacas e presença de raízes;
- ✓ Microestacas em tubetes mantidas em casa de sombra: vigor, número de brotos e folhas e altura das microestacas;
- ✓ Microestacas em tubetes mantidas em pleno sol: vigor, número de brotos e folhas; altura dos sistemas aéreo e radicular; incremento do peso de massa fresca e seca dos sistemas aéreo e radicular.

Vale lembrar que os tratamentos foram aplicados somente nas microestacas quando mantidas em miniestufa, ou seja, nos primeiros 30 dias da aclimatização *ex vitro*. Nas fases seguintes, nenhum tratamento foi aplicado, as análises ocorreram apenas para verificação do efeito dos tratamentos na formação das mudas.

### 5.2.6 Análises histológicas

Para verificar possíveis alterações anatômicas, foram coletadas amostras da base das microestacas tratadas com bioestimulantes na primeira fase da aclimatização *ex vitro*.

Para tanto, secções transversais de material fresco foram confeccionadas a mão livre com auxílio de lâminas de aço em três microestacas de cada tratamento. Os cortes obtidos foram submetidos à dupla coloração com o reagente ácido periódico de Schiff (PAS) e Naphtol blue black (Fisher 1968; Almeida et al. 2012), além de Sudan Black B (Pearse 1968).e montados em lâminas histológicas.

Após a coloração, os materiais foram montados em lâminas semi-permanentes e montadas em glicerina 50% e as imagens foram obtidas em microscópio de luz (Zeiss-Jenemed 2) acoplado a um sistema de captura de imagens (Sansung, SDC-313) com as respectivas escalas na mesma proporção.

### 5.2.7 Delineamento experimental e coleta dos dados

O delineamento experimental estabelecido para a aclimatização *ex vitro* de brotações de *Eucalyptus urophylla* com aplicação de bioestimulantes foi constituído por 2 experimentos com 4 tratamentos x 15 repetições, totalizando 105 amostras. Os dados dos parâmetros morfofisiológicos das microestacas foram analisados com o auxílio do índice baseado em soma de "ranks" (Mulamba; Mock 1978), o qual hierarquiza os parâmetros por atribuição de valores absolutos mais elevados àqueles de melhor desempenho, classificando-os em ordem favorável de cada parâmetro analisado. Por fim, as ordens são somadas, resultando no índice de seleção, como descrito a seguir  $I = r_1 + r_2 + \dots + r_n$ , sendo que  $I$  é o valor do índice para determinado indivíduo ou família;  $r_j$  é a classificação (ou "rank") de um indivíduo em relação ao  $j$ -ésimo caráter;  $n$  é o número de caracteres considerado no índice (Costa et al. 2004; Cruz; Carneiro 2008).

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Aclimatização de brotações de *Eucalyptus* spp com bioestimulantes

Para facilitar a compreensão dos dados, os resultados serão apresentados separadamente nas Tabelas 3 e 4, onde são evidenciados os índices de soma de classificação de notas atribuídas aos parâmetros: vigor, número de brotos e folhas, altura da parte aérea das microestacas e presença de raiz.

Tabela 3 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em microestacas de *Eucalyptus urophylla* em fase de aclimatização em miniestufa. T1: controle (água); T2: 250mg/L de Ácido Tânico na base das microestacas; T3: 1ml/L de Algaren BZn® na base das microestacas e T4: T2 + T3

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros					
	V	NB	NF	AM	PR	Índice
T1	3	1	3	2	3	12
T2	1	2	4	1	4	12
T3	2	2	1	4	2	11
T4	4	2	2	3	1	12

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NB: número de brotos; NF: número de folhas; AM: altura das microestacas; PR: presença de raízes.

Tabela 4 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em microestacas de *Eucalyptus urophylla* em fase de aclimatização em miniestufa. T5: controle (água); T6: 250mg/L de ácido tânico nas bandejas das miniestufas; T7: 1ml/L de Algaren BZn® nas bandejas das miniestufas e T8: T6 + T7

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros					
	V	NB	NF	AM	PR	Índice
T5	2	1	4	3	3	13
T6	3	1	2	2	4	12
T7	4	2	3	1	1	11
T8	1	3	1	3	2	10

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NB: número de brotos; NF: número de folhas; AM: altura das microestacas; PR: presença de raízes.

Ponderando-se a Tabela 3, a aplicação dos bioestimulantes na base das microestacas, ou seja, em cada célula de plantio, nota-se que o tratamento 3 (Algaren BZn®) mostrou-se superior em relação aos demais. Os outros tratamentos apresentaram-se empatados em segundo lugar, sendo eles: T1 (controle); T2 (ácido tânico) e T4 (T2 + T3), além disso, observa-se que, estes tratamentos receberam em

pelo menos um dos parâmetros analisados, a melhor nota no índice de soma de classificação (1), comprovando que, embora não tenham se destacado pelo índice baseado em soma de “ranks”, estes tratamentos apresentaram-se favoráveis ao desenvolvimento das plantas nesta fase de aclimatização (Tabela 3).

Já, em relação à aplicação dos tratamentos nas bandejas (base das miniestufas) (Tabela 4), T8 (Algaren BZn® + ácido tânico) foi o que demonstrou ser o melhor tratamento pela análise do índice de soma de classificação, além disso apresentou a melhor nota (1) para os parâmetros vigor e número de folhas. Em seguida, o T7 (Algaren BZn®), que além de ter sido o segundo melhor tratamento, recebeu nota 1 para os parâmetros altura das microestacas e presença de raízes. Na sequência observa-se, T6 (ácido tânico) e por fim T5 (controle), sendo que esses dois últimos empataram quanto às notas no parâmetro número de brotos, ambos com nota 1 (Tabela 4).

As Tabelas 5 e 6 mostram as médias das notas atribuídas aos parâmetros: vigor, número de brotos e folhas e altura da parte aérea, gerados a partir de avaliações semanais ao longo dos 45 dias em que as microestacas foram mantidas nessas condições, nas fases de aclimatização em tubetes mantidas em casa de sombra.

Tabela 5 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em microestacas de *Eucalyptus urophylla* em fase de aclimatização em casa de sombra. T1: controle; T2: 250mg/L de Ácido Tânico na base das microestacas; T3: 1ml/L de Algaren BZn® na base das microestacas e T4: T2 + T3

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros				
	V	NB	NF	AM	Índice
T1	3	3	3	2	11
T2	2	4	2	4	12
T3	1	1	1	1	4
T4	4	2	4	3	13

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NB: número de brotos; NF: número de folhas e AM: altura das microestacas.

Tabela 6 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em microestacas de *Eucalyptus urophylla* em fase de aclimatização em casa de sombra. T5: controle; T6: 250mg/L de ácido tânico nas bandejas das miniestufas; T7: 1ml/L de Algaren BZn® nas bandejas das miniestufas e T8: T6 + T7

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros				
	V	NB	NF	AM	Índice
T5	3	3	4	3	13
T6	4	1	3	4	12
T7	1	2	2	1	6
T8	2	3	1	1	7

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NB: número de brotos; NF: número de folhas e AM: altura das microestacas.

A Tabela 5 indica que os tratamentos aplicados na base das microestacas apresentaram o mesmo padrão observado nas avaliações realizadas em fase de miniestufa (Tabela 3), observando-se que o tratamento 3 (Algaren BZn®) manteve-se como o melhor tratamento quando aplicado o índice de soma de classificação e, este tratamento obteve a melhor nota (1) para todos os parâmetros analisados. Apesar de nenhum tratamento ter apresentado nota 1 para ao parâmetros observado, observa-se que a nota do índice teve proximidade muito elevada entre eles, indicando que para esta análise, os tratamentos obtiveram efeitos semelhantes.

A Tabela 6 mostra os dados coletados em fase de casa de sombra para aquelas plantas que tiveram os tratamentos aplicados nas bandejas das miniestufas, onde se observa que T7 (Algaren BZn®) foi o melhor tratamento quando aplicado o índice de soma de classificação e apresentou a melhor nota (1) para vigor e altura das microestacas. O segundo melhor resultado, com a nota do índice muito próxima de T7, foi no tratamento 8 (ácido tânico + Algaren BZn®), que também apresentou a melhor nota para altura das microestacas, além do número de folhas. Na sequência destacam os tratamentos 6 (ácido tânico), o qual apresentou nota 1 para o parâmetro número de brotos e, por fim, o tratamento T5 (controle), que não obteve nota 1 para nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 6).

Após o período que as microestacas foram mantidas em casa de sombra, estas foram levadas a pleno sol, onde foi concluída a aclimatização e garantindo, assim, a

finalização da formação de mudas. As análises realizadas nessa fase foram destrutivas, sendo, portanto, a fase que forneceu dados de incremento do peso de massa fresca e seca dos sistemas aéreo e radicular, além da altura destes. Novamente a forma de aplicação dos bioestimulantes que foi realizada em fase de miniestufa, foi analisada separadamente e, as Tabelas 7 e 8 apresentam os dados gerados a partir das avaliações semanais nestas condições.

Tabela 7 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em microestacas de *Eucalyptus urophylla* em fase de aclimatização a pleno sol. T1: controle; T2: 250mg/L de Ácido Tânico na base das microestacas; T3: 1ml/L de Algaren BZn® na base das microestacas e T4: T2 + T3

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros									
	V	NB	NF	MF-SA	MS-SA	ASA	MF-SR	MS-SR	ASR	índice
T1	2	4	1	2	2	2	2	2	3	20
T2	3	2	3	4	3	3	3	3	2	26
T3	1	3	2	1	1	1	1	1	1	12
T4	4	1	4	3	4	4	4	4	4	32

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NB: número de brotos; NF: número de folhas; MF-SA: incremento do peso de massa fresca do sistema aéreo; MS-SA: incremento do peso de massa seca do sistema aéreo; ASA: altura do sistema aéreo; MF-SR: incremento do peso de massa fresca do sistema radicular; MS-SR: incremento do peso de massa seca do sistema radicular e ASR: altura do sistema radicular.

Tabela 8 - Índice de Soma de Classificação para os parâmetros analisados em microestacas de *Eucalyptus urophylla* em fase de aclimatização a pleno sol. T5: controle; T6: 250mg/L de ácido tânico nas bandejas das miniestufas; T7: 1ml/L de Algaren BZn® nas bandejas das miniestufas e T8: T6 + T7

Tratamentos	Notas atribuídas aos parâmetros									
	V	NB	NF	MF-SA	MS-SA	ASA	MF-SR	MS-SR	ASR	índice
T5	1	3	2	3	3	2	2	1	3	20
T6	4	1	4	4	4	4	4	4	4	33
T7	2	2	3	2	2	1	1	2	1	16
T8	3	2	1	1	1	3	3	3	2	19

Nota: O índice representa a somatória dos parâmetros avaliados sendo que, menores valores representam melhores resultados. A escala de cores apenas foi utilizada de modo a auxiliar na visualização dos resultados. Os parâmetros analisados foram: V: vigor; NB: número de brotos; NF: número de folhas; MF-SA: incremento do peso de massa fresca do sistema aéreo; MS-SA: incremento do peso de massa seca do sistema aéreo; ASA: altura do sistema aéreo; MF-SR: incremento do peso de massa fresca do sistema radicular; MS-SR: incremento do peso de massa seca do sistema radicular e ASR: altura do sistema radicular.

A Tabela 7 evidencia que os tratamentos aplicados na base das microestacas novamente apresentaram o mesmo padrão observado nas avaliações realizadas em fase de miniestufa (Tabela 3), e observa-se que T3 (Algaren BZn<sup>®</sup>), ainda foi o melhor tratamento, apresentando a melhor nota (1) para quase todos os parâmetros analisados, exceto número de brotos e folhas. Na sequência, o tratamento controle (T1), apresentou nota 1 apenas para número de folhas, seguido do tratamento 2 (ácido tânico) e por fim, consideramos o pior tratamento quando aplicado o índice de soma de classificação, o T4 (ácido tânico + Algaren BZn<sup>®</sup>), embora tenha apresentado a melhor nota (1) para o parâmetro número de brotos (Tabela 7).

A Tabela 8 evidencia os mesmos resultados observados na Tabela 6, na qual, o tratamento com Algaren BZn<sup>®</sup> (T7), continuou como o tratamento mais favorável, apresentando a melhor nota (1), para os parâmetros altura do sistema aéreo e radicular e incremento do peso da massa fresca do sistema radicular. O segundo melhor tratamento foi T8 (ácido tânico + Algaren BZn<sup>®</sup>), cujos parâmetros número de folhas e incremento dos pesos de massa fresca e seca do sistema aéreo apresentaram a melhor nota (1). Na sequência veio T5 (controle), com melhor nota (1), para os parâmetros vigor e incremento do peso da massa seca do sistema radicular. E por fim, o pior tratamento quando aplicado o índice de soma de classificação, foi T6 (ácido tânico), que apresentou nota 1 apenas para o parâmetro número de brotos (Tabela 8).

### 5.3.2 Análises histológicas

Após a coleta da região proximal de microestacas de *Eucalyptus urophylla*, cortes a fresco foram realizados para verificar a origem celular das raízes formadas. Os tratamentos não apresentaram diferenças histológicas. Desta forma, a Figura 4 representa o padrão observado em todas as microestacas utilizadas como amostra para esta análise.

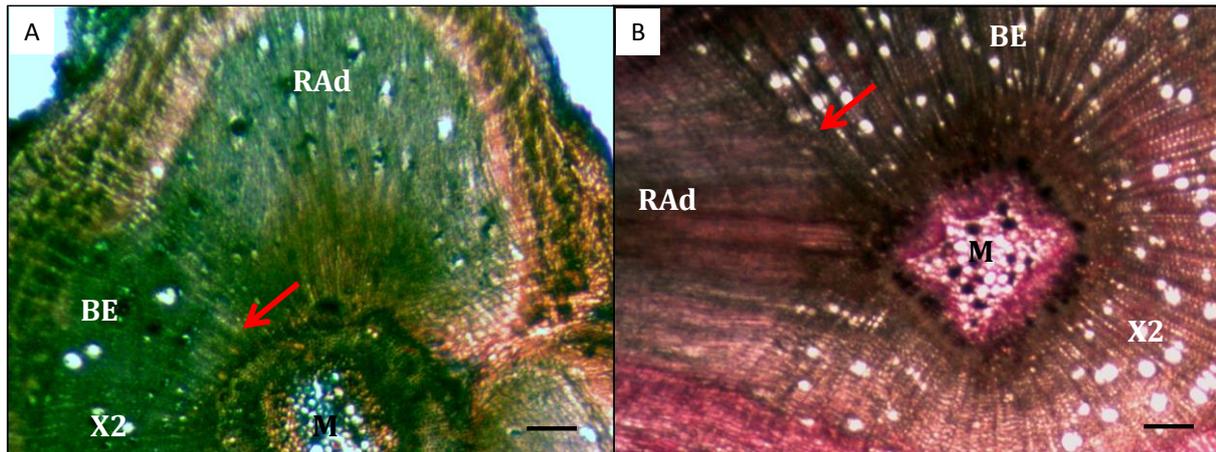


Figura 4: Secções transversais de corte de material fresco da região proximal da base de microestacas de *Eucalyptus urophylla*. Para A e B: RAAd: corte longitudinal das raízes adventícias; BE: corte transversal da base da microestaca; X2: xilema secundário; M: medula; setas: conexão vascular entre os sistemas radicular e aéreo

#### 5.4 DISCUSSÃO

A técnica de microestaquia é advinda da micropropagação vegetal, cujo elevado grau de rejuvenescimento é expandido, garantindo aumento nas taxas de enraizamento quando comparado com outras técnicas de propagação. No caso do *Eucalyptus* são utilizadas para este fim, microcepas (“tufos” de brotações) em fase de alongamento *in vitro* (Higashi; Silveira; Gonçalves 2005; Leone 2013).

A micropropagação de plantas proporciona alta taxa de multiplicação de propágulos, possibilitando a clonagem de espécies e híbridos de genótipos selecionados com alto valor comercial o que a torna efetivamente, bastante interessante, porém muitas dificuldades são encontradas na fase de rizogênese e, portanto, merecem atenção e pesquisa. Por proporcionar maior grau de juvenildade quando comparado às minicepas, obtidas por métodos clássicos de miniestaquia *in vivo*, o desenvolvimento e cultivo de microestacas vêm como uma alternativa para sanar as dificuldades que as espécies de *Eucalyptus* comumente apresentam (Ratnieks; Assis 1993; Xavier; Silva 2010).

Entretanto, muitas vezes, apenas o uso da técnica de micropropagação não é o suficiente para o sucesso na aclimatização e enraizamento de *Eucalyptus*, bem como na produção de mudas, sendo indispensável à criação de protocolos que visem uma melhoria na produtividade de espécies do gênero (Brondani 2012).

A importância socioeconômica que o eucalipto apresenta em âmbito mundial, ocorre em função da alta demanda requerida por seus subprodutos, de seu uso para recuperação de áreas degradadas e minimização do extrativismo de madeiras nobres há séculos exploradas (Teixeira et al. 2009). Assim, a busca pela redução nos custos advindos de seu cultivo, é crescente não apenas na maximização do número de mudas via técnicas convencionais de estaquia, como também no surgimento de biofábricas e laboratórios de pesquisa que visam otimizar e acelerar a produção de espécies e clones com superioridade genética. Por muito tempo, fertilizantes inorgânicos e sintéticos foram utilizados para estes fins e amplamente aceitos como uma forma eficiente de aliviar estes problemas, no entanto com a onda verde que se propaga no Brasil e no mundo, produtos que sejam *eco-friendly*, ou seja, aqueles que sejam sustentáveis e ambientalmente corretos vêm sendo vastamente pesquisado e têm gerado um crescente interesse pelo uso de bioestimulantes naturais, que melhorem o rendimento sem afetar a qualidade da planta (Aremu et al. 2015; Jan et al. 2019).

Assim, neste trabalho optou-se pelo uso de dois bioestimulantes na aclimatização de microestacas de *Eucalyptus urophylla*: o ácido tânico, um tanino produzido no metabolismo secundário das plantas (Peres 2004) e o Algaren BZn®, produto comercial composto pelo extrato da alga *Ecklonia maxima* acrescido de boro e zinco.

A aclimatização *ex vitro* de microestacas de *Eucalyptus* spp ocorre em três ambientes distintos, sendo o primeiro deles, a sala de crescimento com temperatura, fotoperíodo e luminosidade controlados, que é a mesma utilizada para a micropropagação. Assim, quando as brotações são coletadas e transferidas para miniestufa, a manutenção destas no mesmo ambiente em que vinham sendo cultivadas, é de extrema importância para evitar estresses fisiológicos e perda de material vegetal. Na segunda fase, que consiste de casa de sombra, as microestacas vão sendo aos poucos expostas ao ambiente externo e dessa forma, podemos dizer que estamos adaptando as mudas que serão conduzidas, em uma terceira fase, para o

ambiente a pleno sol, finalizando a rustificação das mudas, como descrito por Brondani (2012).

Ao se realizar revisões bibliográficas para determinar a metodologia a ser utilizada neste experimento, nos deparamos com trabalhos como o de Scheffer-Basso; Voss; Jacques (2001) que utilizam com sucesso a técnica de vaso de Leonard para a aplicação de produtos que visem incrementar a produtividade de plantas forrageiras, no caso da aclimatização de brotações alongadas *in vitro* de *Eucalyptus* spp, esta é uma técnica que já vem sendo utilizada, em associação ao uso de tampas plásticas transparentes para evitar a perda de água do material vegetal para o ambiente externo (Brondani 2012; Oliveira 2014; Dias 2016). Além disso, trabalhos como de Almeida (1999) e Santos et al. (2017) realizam a aplicação de bioestimulantes diretamente na base de suas plantas

Desta forma, para este trabalho, a aplicação dos bioestimulantes foi realizada de duas formas: na base das microestacas e nas bandejas (base das miniestufas), compondo os tratamentos descritos na Tabela 1. Suas aplicações foram feitas semanalmente e apenas na primeira fase da aclimatização *ex vitro* (miniestufa), sendo que, nas demais fases, as avaliações foram realizadas para acompanhar o efeito destes tratamentos nas plantas.

O bioestimulante Algaren BZn<sup>®</sup> quando aplicado na base das microestacas demonstrou ser o melhor tratamento (Tabelas 2, 4 e 6), apresentando notas superiores quando utilizado o índice de soma de classificação que, de acordo com Mulamba; Mock (1978) ocorre uma hierarquização dos parâmetros por atribuição de valores absolutos mais elevados àqueles de melhor desempenho, ou seja, quando em contato direto com as plantas, o extrato de alga parece aumentar seus efeitos morfogênicos, corroborando com os dados de Tarjan (1977), que notou em seu trabalho que extratos da alga *Ascophyllum nodosum* melhorou os parâmetros vegetais por ele avaliados em citrus. O mesmo foi observado por Massa (2010) que utilizou extrato das algas *Ascophyllum nodosum* e *Ecklonia maxima* em tomateiros, constatando a melhoria do vegetal quando associado a estes produtos.

Pesquisas apontam que o uso de bioestimulantes na agricultura vem demonstrando afetar positivamente o estado geral da planta, aumentando sua resistência a doenças e pragas, além de melhorar a qualidade do rendimento da cultura (Ciepiela; Godlewska; Jankowska 2016). O Algaren BZn<sup>®</sup> é um extrato de alga da espécie *Ecklonia maxima* que vem sendo amplamente utilizado na agricultura, principalmente porque já foram identificados reguladores de crescimento vegetais relacionados a esta alga, tais como, auxinas, citocininas, poliaminas, giberelinas, ácido abscísico e brassinosteróides, além de polissacarídeos, aminoácidos e macro e micronutrientes necessários ao desenvolvimento vegetal (Rengasamy et al. 2015; Ciepiela; Godlewska; Jankowska 2016). Corroborando com as afirmações de Carvalho; Castro (2014) e Araújo (2016), o uso de extratos de algas pode auxiliar no estabelecimento da planta, além de aperfeiçoar o sistema radicular, refletindo no estabelecimento em campo e na produtividade vegetal.

De acordo com Chiminelli (2017), o produto comercial Algaren BZn<sup>®</sup> está envolvido no estímulo da produção de citocininas e, conseqüentemente, pode estimular o enraizamento, corroborando com os dados apresentados nas Tabelas 6 e 7, na qual observa-se que os dados referentes às raízes apresentaram resultados mais favoráveis neste tratamento, tanto quando aplicado na base das microestacas (T3) quanto nas bandejas das miniestufas (T7).

O Algaren BZn<sup>®</sup> quando utilizado em associação com o ácido tânico, demonstrou ser o melhor tratamento para a aclimatização de microestacas de eucaliptos, principalmente quando foram aplicados nas bandejas (base da miniestufa) (T8), assemelhando-se a um vaso de Leonard, comumente utilizado na aclimatização *ex vitro* de *Eucalyptus* spp (Brondani 2012; Oliveira 2014; Dias 2016) (Tabelas 3; 5 e 7). A partir da segunda fase da aclimatização, em ambiente de casa de sombra, o melhor tratamento foi T7 (Algaren BZn<sup>®</sup>).

Neste contexto, quando o produto Algaren BZn<sup>®</sup> foi adicionado ao ácido tânico, observamos resultados favoráveis quando aplicado nas bandejas das miniestufas (Tabelas 3; 5 e 7), corroborando com os resultados observados por França (2016), que

em seu trabalho utilizou esta metodologia para verificar o potencial de bioestimulantes no desenvolvimento de *Calophyllum brasiliensis* Cambess.

No entanto, quando o tratamento composto pela união dos dois bioestimulantes aplicados diretamente na base das microestacas (T4), observamos os piores resultados em todas as fases da aclimatização *ex vitro* (Tabelas 2; 4 e 6). Este resultado pode ser associado ao fato de que as microestacas apresentam alta sensibilidade como já relatado por Ferrari; Grossi; Wendling (2004), tendo em vista que estas são advindas de plantas micropropagadas são, portanto, extremamente frágeis e a aplicação de um conjunto de produtos intensificou o processo de oxidação, afetando estas plantas em todas as demais fases da aclimatização *ex vitro*, mesmo quando não houve mais aplicação dos bioestimulantes.

Com relação ao ácido tânico, de maneira oposta ao observado neste mesmo trabalho quando aplicado em miniestacas (Capítulo 2 - Bioestimulantes aplicados na miniestaca de *Eucalyptus* spp) e quando adicionado ao meio de cultura para o alongamento *in vitro* de brotações de *Eucalyptus* e posterior aclimatização (Capítulo 3 - Aclimatização de microestacas de *Eucalyptus* alongadas *in vitro* com bioestimulantes), este bioestimulante apresentou resultados insatisfatórios quando utilizado diretamente na primeira fase da aclimatização *ex vitro* de *Eucalyptus* (miniestufa), tanto quando aplicado na base das microestacas quanto nas bandejas das miniestufas (Tabelas 2 a 7).

O ácido tânico é um composto fenólico produzido pelo metabolismo secundário das plantas e seus precursores são provenientes da rota do ácido chiquímico (Peres 2004; Voet; Voet 2006). Sabendo-se que o metabolismo de plantas micropropagadas preferencialmente segue a via do ácido chiquímico, acredita-se que neste trabalho houve uma fitotoxicidade causada pelo excesso de metabólitos secundários aí encontrados (Amaral-Baroli et al. 2016). Almeida (1999) ressalta que o ácido tânico pode influenciar no desenvolvimento radicular, corroborando com este trabalho, no qual observamos que a presença deste bioestimulante afetou de forma negativa na morfogênese radicular (Tabelas 2 a 7), principalmente quando aplicado nas bandejas

(base das miniestufas), na fase final da aclimatização (ambiente de pleno sol), obteve-se que o T6 foi o pior tratamento empregado para todos os parâmetros, exceção apenas à produção de brotos (Tabela 6), resultado esperado, tendo em vista que a relação existente entre as raízes e a parte aérea foi afetada pelo baixo desenvolvimento radicular, desta forma, as plantas alocam suas reservas para a parte aérea, bem como, a fixação de carbono, absorção de água e nutrientes e a produção de reguladores de crescimento, altamente demandada, pois são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das brotações, garantindo a sobrevivência vegetal (Reis; Reis 1997).

Já, o tratamento controle, nos dois experimentos empregados demonstra resultados normalmente obtidos na aclimatização *ex vitro* de *Eucalyptus* spp, tendo em vista que o uso de bioestimulantes não é uma prática comum na micropropagação. Desta forma, este trabalho demonstra que, o uso de bioestimulantes agrega valores significativos no desenvolvimento das microestacas, garantindo um vigor favorável, ótima formação do sistema radicular e, conseqüentemente, uma melhor adaptação das plantas no campo.

Apesar das microestacas terem apresentado diferenças no desenvolvimento ao longo das fases de aclimatização (Tabelas 2 a 7), todas as raízes desenvolvidas neste experimento foram classificadas, por meio de análises anatômicas, como raízes funcionais com origem direta, ou seja, apresentaram conexão com o câmbio vascular das microestacas (Figura 4).

Tendo em vista que a qualidade da raiz emitida em condições *ex vitro* originada por todas as fases da aclimatização (miniestufa, ambiente de casa de sombra e pleno sol), é um dos principais fatores de redução do custo de plantas micropropagadas, o sucesso nestas fases, garante a rustificação total da muda, tornando-a apta para adaptação ao campo (Nehra et al. 2005; Davey; Anthony 2010). Desta forma, nota-se que as raízes formadas são semelhantes às raízes típicas, àquelas provenientes do desenvolvimento direto da radícula ou de suas ramificações de plantas com sementes (Almeida; Almeida 2014).

## 5.5 CONCLUSÕES

- ✓ O uso de Algaren BZn<sup>®</sup> na concentração de 1ml/l otimiza o enraizamento de microestacas de *Eucalyptus*;
- ✓ A aplicação de ácido tânico na base das microestacas não foi um bom tratamento, enquanto que quando aplicado nas bandejas das miniestufas foi indiferente;
- ✓ Nenhum dos tratamentos aplicados causou alterações estruturais nas raízes adventícias desenvolvidas.

## REFERÊNCIAS

- Almeida M, Almeida CV (2014) Morfologia da raiz de plantas com sementes. Piracicaba: ESALQ/USP, 71p. Disponível em: <http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/44838>
- Almeida M, Almeida CV, Graner EM, Brondani GE, Abreu-Tarazi MF (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Report* 31:1495–1515
- Amaral-Baroli A, Lago JHG, Almeida CV, Almeida M, Scotti MT, Leone GF, Soares MG, Cavallari AA, Sartorelli P (2016) Variability in essential oil composition produced by micropropagated (*in vitro*), acclimated (*ex vitro*) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*. 86:180-185
- Araújo DK (2016) Extratos de *Ascophyllum nodosum* no tratamento de sementes de milho e soja: avaliações fisiológicas e moleculares. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 109p.
- Aremu AO, Masondo NA, Rengasamy KRR, Amoo SO, Gruz J, Bíba O, Subrtova M, Pencik A, Novák O, Dolezal K, Van Staden J (2015) Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. *Planta*. 241:1313–1324
- Assis TF, Rosa OP, Gonçalves SI (1992) Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. In: Congresso Florestal Estadual, 7. Nova Prata, Anais. Santa Maria: UFSM. 1992. P.824-837.
- Baccarin FJB (2012) Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 78p.
- Blakesley D, Weston GD, Hall JF (1991) The role of endogenous auxin in root initiation. *Plant Growth Regulation* 10(4):341-353

- Brondani GE (2012) Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*. 2012. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 184p.
- Brondani GE, Ondas HWW, Baccarin FJB, Gonçalves AN, Almeida M (2012) Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 48(5):35-48
- Carvalho MEA, Castro PRC (2014) Extratos de algas e suas aplicações na agricultura. Série Produtor Rural - nº 56, 60p.
- Ciepiela GA, Godlewska A, Jankowska J (2016) The effect of seaweed *Ecklonia maxima* extract and mineral nitrogen on fodder grass chemical composition. *Environ Sci Pollut Res*. 23:2301-2307
- Correia ACG, Xavier A, Dias PC, Titon M, Santana RC (2015) Redução foliar em miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Revista Árvore*. 39(2):295-304
- Costa CT, De Almeida MR, Ruedell CM, Michels C, Schwambach J, Maraschin FS, Fett-Neto AG (2013) When stress and development go hand in hand: Main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science* 4:133–19
- Costa MM, Di Mauro AO, Unêda-Trevisoli SH, Arriel NHC, Bárbaro IM, Muniz FRS (2004) Ganho genético por diferentes critérios de seleção em populações segregantes de soja. *Pesq. agropec. bras*. 39(11):1095-1102
- Cruz CD, Carneiro PCS (2008) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2.ed. Viçosa: UFV.
- Davey MR, Anthony P (2010) Plant cell culture: essencial methods. Singapore: Markono Print Media Pte. 341p.
- De Almeida MR, Bastiani D, Gaeta ML, Mariath JEA, Costa F, Retallick J, Nolan L, Tai HH, Strömvik MV, Fett-Neto AG (2015) Comparative transcriptonal analysis provides new insights into the molecular basis of adventitious rooting reclacitrance in *Eucalyptus*. *Plant Scienc* 239:155-165
- De Klerk GJ, Van Der Krieken W, De Jong JC (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 35:189–199
- Dias RZ (2016) Poliploidização induzida *in vitro*, como estratégia biotecnológica para a otimização da cultura de eucalipto. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 66p.
- Dutra LF, Wendling I, Brondani GE (2009) A micropropagação de eucalipto. *Pesq. Flor. Bras*. 58:49-59
- Ferrari MP, Grossi F, Wendling I (2004) Propagação vegetative de espécies florestais. Colombo: Embrapa Florestas. 22p. (Embrapa Florestas. Documentos, 94).
- Fisher DB (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*. 16:92-96
- França DM (2016) Bioinsumos à base de substâncias húmicas podem afetar o crescimento inicial de *Calophyllum brasiliensis* Cambess? Dissertação (Mestrado em Agronomia) –

Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária “FAV”, Brasília/DF, 48p.

- Fogaça CM (2003) Papel de auxinas e seus moduladores na rizogênese de *Eucalyptus globulus* Labill e *Eucalyptus saligna* Smith. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 70p.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT (1990) Plant Propagation: Principles and Practices. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. 5th ed.
- Higashi EM, Silveira RLVA, Gonçalves NA (2000) Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Circular Técnica IPEF, Piracicaba, n.192, p.11.
- IBÁ (2017) Indústria Brasileira de Árvores. Relatório IBÁ 2017, Brasília, 80p.
- Jan FG, Hamayun M, Hussain A, Jan G, Iqbal A, Khan A, Lee IJ (2019) An endophytic isolate of the fungus *Yarrowia lipolytica* produces metabolites that ameliorate the negative impact of salt stress on the physiology of maize. BMC Microbiology. 19:3
- Leone GF (2013) Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 101p.
- Lloyd G, McCown B (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagators Society. 30:421-427
- Massa NB (2010) The use of seaweed-based products from *Ecklonia maxima* and *Ascophyllum nodosum* as control agents for *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* on tomato plants. Dissertação (Mestrado em Nematologia) – Universidade de Gante, Gante/Bélgica, 29p.
- Mulamba NN, Mock JJ (1978) Improvement of yield potential of the *Eto Blanco* maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. Egyptian Journal of Genetic and Cytology, Giza, 7:40-51
- Murashige T, Skoog F (1962) A review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15:473-493
- Nehra NS, Becwar MR, Rootmann WH, Pearson L, Chowdhury K, Chang S, Wilde HD, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW, Hinchee MA (2005) Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 41(6):701-717.
- Oliveira LS, Xavier A, Dias PC, Correia ACG, Borges SR, Takahashi EK, Paiva HN (2012) Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. Scientia Forestalis. 40(96):507-516
- Oliveira LS (2014) Propagação de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. Tese (Silvicultura e Manejo Florestal). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 145p.
- Pearse AGE (1968) Histochemistry. Theoretical and Applied. Boston: Little, Brown. 759p.

- Peres LEP (2004) Metabolismo Secundário. Apostila da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 26p.
- Ratniekes E, Assis TF (1993) O que há adiante da árvore? O papel. 54(1):41-48
- Reis GG, Reis MGF (1997) Fisiologia da brotação de eucalipto com ênfase nas suas relações hídricas. Série técnica IPEF. 11(30):9-22
- Rengasamy KRR, Kulkarni MG, Stirk WA, Van Staden J (2015) Eckol - a new plant growth stimulant from the brown seaweed *Ecklonia maxima*. J Appl Phycol. 27:581-587
- Santos-Serejo JA, Junghans TG, Soares TL, Silva KM (2006) Meios Nutritivos para Micropropagação de Plantas. In: Souza AS; Junghans TG. Introdução à micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 152p.
- Santos VM, Aurélio Vaz de Melo AV, Cardoso DP, Gonçalves AH, Sousa DCV, Silva AR (2017) Uso de bioestimulantes no crescimento de plantas de soja. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. 12(3):512-517
- Scheffer-Basso SM, Voss M, Jacques AVÁ (2001) Nodulação e Fixação Biológica de Nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em Vasos de Leonard. Rev. bras. zootec. 30(3):687-693
- Tarjan AC (1977) Kelp derivatives for nematode-infected citrus trees. Journal of nematology. 9:287
- Vincent JM (1970) A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p.
- Xavier A, Silva RL (2010) Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. Agronomia Costarricense. 34:93-98



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nos experimentos realizados para otimizar a produção de mudas clonais de eucalipto, inferiram que o uso dos bioestimulantes apresentou resultados superiores aos tratamentos controle, ou seja àqueles comumente empregados nas técnicas de propagação clonal.

Para a obtenção de miniestacas, sugerimos o uso de 250mg/L de ácido tânico associado com 1ppm de AIB (aplicado no momento da estaquia). Para microcepas de eucaliptos, é aconselhável a aplicação da mesma dosagem do ácido tânico em meio de cultura WPM associado aos hormônios vegetais utilizados para alongamento das brotações, otimizando assim, a sua aclimatização.

Os bioestimulantes usados na fase de aclimatização das microestacas, podem ser aplicados de duas maneiras: na base das microestacas e diretamente na bandeja das miniestufas. Neste caso, sugerimos o uso de Algaren BZn® (1ml/L).

Assim, de forma geral, constatamos que a adição de bioestimulantes na propagação clonal de *Eucalyptus benthamii*; *E. urograndis* *E. urophylla* otimiza a produção de mudas saudáveis e com sistema radicular funcional.