Efeitos da nutrição mineral, coleta de brotações e ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento e histologia de miniestacas de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake

Mineral nutritional, shoot collection and indol-3-butyric acid (IBA) on adventitious rooting and histology of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake minicuttings

Alessandra da Silva Lopes¹, Antonio de Arruda Tsukamoto Filho¹,
Gilvano Ebling Brondani², Dagma Kratz³, David da Silva⁴,
Sheila Espíndola de Matos¹ e Tupiara Mergen de Oliveira¹

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus urophylla* em relação à diferentes concentrações de solução nutritiva, coleta de brotações e ácido indolbutírico (AIB) e analisar histologicamente o enraizamento adventício em relação à concentração de solução nutritiva, AIB e tempo de avaliação visando identificar a origem da conexão vascular. Foram coletadas brotações oriundas de minicepas manejadas com três concentrações de solução nutritiva 25%, 75% e 100% fertirrigadas com 100mL de solução básica. A região basal das miniestacas foram imersas por 10 segundos em solução hidroalcoólica de AIB em duas diferentes concentrações (0 – isento de AIB; 1000 mg L⁻¹) em quatro coletas sucessivas para avaliação da quantidade de raiz, comprimento da maior raiz (CMR), enraizamento e altura total das miniestacas. As análises histológicas as amostras foram desidratadas em solução alcoólico-etílica emblocadas em resina de hidroxietil metacrilato, montado lâminas histológicas, analisadas e fotomicrografadas com microscópio de luz em escala micrométrica. O experimento foi conduzido no delineamento bloco casualizado em arranjo fatorial (3x2x4) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por solução nutritiva (S1 – 100%, S2 – 75%, S3 – 25%), AIB (ausência e 1.000 mg.L⁻¹) e por coleta de brotações (4 coletas), com cinco blocos contendo sete miniestacas cada uma. A análise histológica foi conduzido no delineamento bloco casualizado em arranjo fatorial (3x2x4) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por solução nutritiva (S1 – 100%, S2 – 75%, S3 – 25%), ausência e presença de AIB (ausência e 1.000 mg.L⁻¹) e por quatro tempos de avaliação (0, 10, 20 e 30 dias). Houve interação entre os fatores para quantidade de raiz, comprimento da maior raiz (CMR), percentagem de enraizamento e altura total das miniestacas. No geral, a solução nutritiva de 75% e 100%, a presença de AIB e a 1ª e 4ª coleta apresentaram os melhores resultados quanto o enraizamento adventício. Foi verificado histologicamente a formação de centros meristemáticos junto ao câmbio vascular, sendo que a raiz adventícia apresentou conexão direta com o câmbio vascular.

Palavras-chave: Enraizamento adventício; ácido indolbutírico; análise histológica.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the adventitious rooting in *Eucalyptus urophylla* minicuttings in relation to the nutrient solution concentrations, shoot collection and IBA and analyze histologically the adventitious rooting in relation to the concentration of nutrient solution, IBA and evaluation time targeting identifying the origin of the vascular connection. Shoots were collected originated from ministumps managed with three nutrient solution concentrations of 25%, 75% and 100% fertigated with 100ml of basic solution. The basal region of the cuttings were dipped for 10 seconds in IBA hydroalcoholic solution at two different concentrations (0 - free of IBA; 1000 mg L⁻¹) in seven successive sampling to evaluate the amount of root, the longest root length, rooting and total height of cuttings. For histological analysis samples were dehydrated in alcohol-ethyl solution embedded in resin hydroxyethyl methacrylate, mounted histological slides, analyzed and photomicrographed with light microscope on a micrometric scale. The experiment was conducted in two parts with the first completely randomized in a factorial arrangement (3x2), and the factors consisting of

1. Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT. Cuiabá / MT, Brasil.

2. Universidade Federal de Lavras – UFLA. Lavras / MG, Brasil.

3. Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba / PR, Brasil.

4. Empresa Matogrossense de Pesquisa – EMPAER. Cuiabá / MT, Brasil.

*Autor Correspondente: gilvano.brondani@ufla.br

nutrient solution (S1 - 100% S2 - 75% S3 - 25%) and the absence and presence of IBA (0 and 1,000 mg L⁻¹), with four replications, each with four minicuttings. A solution of 100% and the presence of IBA favored the induction of a greater amount of root, the longest root length and total height of the cuttings for the 1st collection. It was not found significant difference for the 2nd and 3rd collections. For rooting the 1st collects 75% solution showed better average and the 2nd collect the solution of 75% and 100%, regardless of IBA favored rooting. The second stage corresponded 4th to 7th collection was conducted in the design randomized block in factorial arrangement (3x2x4) with split plot, and the factors consisting of nutrient solution (S1 - 100% S2 - 75% S3 - 25%), IBA (absence and 1,000 mg L⁻¹) and collection of shoots (4 collections) with five blocks containing seven minicuttings each. Histological analysis was conducted in the design randomized block in factorial arrangement (3x2x4) with split plot, and the factors consisting of nutrient solution (S1 - 25% S2 - 75% S3 - 100%), absence and presence of IBA (1000 absence and mg.L⁻¹) and four evaluation times (0, 10, 20 and 30 days). There was interaction between the factors for the amount of root, the longest root length, rooting percentage and total height of cuttings. Overall, the nutrient solution 75% and 100%, the presence of IBA and the 4th and 7th collection showed the best results as the adventitious rooting. It was histologically verified the formation of meristematic centers by the vascular cambium, and the adventitious root showed a direct connection to the vascular cambium.

Keywords: Adventitious rooting; Minicutting; Indol-3-butyric acid; Histological analysis.

INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa de espécies florestais auxilia na obtenção de mudas de alta qualidade a partir da clonagem de genótipos superiores, facilitando a produção de mudas para plantios homogêneos.

Dentre as técnicas de propagação vegetativa, a miniestaquia surge como alternativa para suprir a necessidade do resgate da juvenilidade do material vegetativo (FERRIANI et al., 2010; HARTMANN et al., 2011).

Nessa técnica, o enraizamento adventício é uma etapa essencial e complexa, principalmente para as espécies de grande valor econômico (FETT-NETO et al., 2001), como por exemplo o *Eucalyptus urophylla*, que possui alto valor agregado e é de grande importância, usado principalmente na produção de celulose, lenha e carvão vegetal, sendo uma das espécies mais plantadas no Brasil (SEIN; MITLOHNER, 2011).

A formação de raiz adventícia compreende três fases: 1ª) indução: período que ocorre às primeiras modificações moleculares e bioquímicas que precede a formação dos primórdios da raiz; 2ª) iniciação: onde ocorre as divisões celulares, formação do meristema e primórdios da raiz e; 3ª) expressão: compreende o crescimento e emergência da raiz (GOULART, et al., 2014; KEVERS et al., 1997).

Em espécies lenhosas, as raízes adventícias em propágulos como estacas e miniestacas, geralmente tem origem em tecidos do floema secundário, câmbio ou calos, sendo que a capacidade rizogênica depende da interação de fatores endógenos e exógenos (BRONDANI et al., 2012; FRASSETTO et al., 2010).

De acordo com Alfenas et al. (2009) e Brondani et al. (2014a) a nutrição mineral das minicepas, de onde são retiradas as brotações, tem influência sobre o estado nutricional do material coletado e na formação de raízes. Uma planta com composição nutricional equilibrada irá aumentar a capacidade de produção de propágulos predispostos ao enraizamento.

A utilização de reguladores vegetais exógenos apresenta-se com eficiência no processo rizogênico e na propagação vegetativa com a otimização do enraizamento através da indução, aumento no número de raízes e melhoria na qualidade das raízes formadas, sendo o ácido indolbutírico (AIB) o mais utilizado por ser uma substância mais estável (ALFENAS et al., 2009; BRONDANI et al., 2014b). As concentrações de auxinas variam com a espécie, clone, a maturação do propágulo e a forma de aplicação do regulador (HARTMANN et al., 2011). Na propagação vegetativa por estaquia de *Eucalyptus* o AIB comumente é utilizado em dosagens maiores que variam de 6000 a 8000 mg L⁻¹ (BRONDANI et al., 2012). Entretanto com a evolução da técnica de propagação e a utilização da miniestaquia a tendência é a utilização de dosagens cada vez menores de AIB até a suspensão do regulador de alguns casos (ALFENAS et al., 2009, ALMEIDA et al., 2007).

As coletas de brotações pode ser um fator decisivo no enraizamento pois estão condicionadas as estações do ano e as variações climáticas. Esses fatores podem influenciar no enraizamento das

estacas por afetar as condições fisiológicas, o balanço hormonal, o crescimento e o grau de lignina das minicepas fornecedoras dos propágulos (ALCANTARA et. al., 2008).

O conhecimento das alterações histológicas e anatômicas durante o processo rizogênico fornece informações importantes que permitem otimizar e maximizar o processo de formação de raiz e propagação clonal, das miniestacas de *Eucalyptus urophylla*.

Deste modo, o trabalho teve como objetivo avaliar o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus urophylla* em relação às concentrações de solução nutritiva, coleta de brotações e influência do AIB, assim como analisar histologicamente o enraizamento adventício, visando identificar a origem da conexão vascular.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em um viveiro particular localizado em Cuiabá, Mato Grosso, onde o clima é do tipo AW (chuvas de verão-outono), segundo a classificação de Köppen, e as médias anuais de temperatura de 37°C nos meses mais quentes (agosto a outubro) e de 30°C nos meses mais frios (abril a junho), com precipitação média anual em torno de 1.200 mm. Na casa de vegetação instalou-se um Data Logger modelo w / USB 1" LCD para monitoramento da temperatura e umidade (Tabela 1).

Para a formação das minicepas foram utilizadas sementes de *Eucalyptus urophylla* originárias de matrizes de um experimento em Itatinga – SP. A semeadura foi realizada em bandejas de isopor, colocando-se uma semente por célula, preenchida por substrato comercial a base de matéria orgânica composta por esterco de galinha, húmus de minhoca e vermiculita na proporção (1:1:1 v/v).

No sétimo dia após a semeadura, as mudas sem problemas fitossanitários, com crescimento ortotrópico normal e altura em torno de 5 cm, foram repicadas para vasos plásticos de 3,0 L, contendo 3 cm de camada de brita na base e preenchidos com substrato de areia fração fina, alocados no minijardim coberto com sombrite 50%. De acordo com o arranjo dos blocos, os vasos plásticos foram dispostos sobre área de 0,12 m² coberta com uma camada de 10 cm de brita compondo o minijardim clonal. Foram feitas irrigações das mudas duas vezes ao dia.

Tabela 1 - Dados coletados pela estação 83361 de Cuiabá – MT, latitude -15,61°, longitude -56,1° e altitude 145 metros, retirados do banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET.

Table 1 - Data of mean maximum temperature, average minimum temperature and average relative humidity between June 2014 and January 2016.

Meses	TMáx (°C)	TMín (°C)	UR (%)
Jun/14	31,02	19,77	72,63
Jul/14	31,02	17,88	70,68
Ago/14	35,25	19,15	55,13
Set/14	37,00	23,72	58,73
Out/14	36,82	24,15	67,44
Nov/14	34,53	24,02	69,78
Dez/14	33,13	23,73	74,83
Jan/15	34,10	23,13	73,27
Fev/15	33,33	23,34	76,60
Mar/15	33,49	23,14	77,83
Abr/15	32,87	23,31	78,03
Mai/15	31,92	21,96	75,19
Jun/15	32,84	19,14	67,65
Jul/15	32,01	18,33	67,78
Ago/15	36,82	19,46	50,10
Set/15	37,62	23,51	52,76
Out/15	35,32	24,34	61,79
Nov/15	33,50	24,63	71,52
Dez/15	32,50	24,49	68,65
Jan/16	30,31	24,08	71,00

TMáx – média das temperaturas máximas; TMín – média das temperaturas mínimas; UR – média da umidade relativa do ar.

A quebra do caule da planta foi realizada após 70 dias da repicagem, 18 cm acima do coleto, para superar a dormência apical e induzir a formação de brotos axilares. Após 21 dias, foi realizada a poda da parte aérea cortando com tesoura a porção do caule quebrado, permitindo assim a formação das minicepas e o início das adubações com as diferentes concentrações da solução nutritiva.

Os tratamentos foram compostos por solução nutritiva nas seguintes concentrações: S1 – 100% de solução nutritiva, S2 – 75% de solução nutritiva e S3 – 25% de solução nutritiva. Os sais de nutrientes foram pesados em balança de precisão e posteriormente diluídos em água destilada nas proporções estabelecidas na Tabela 2, sendo armazenados em garrafas pet. O pH da solução nutritiva foi aferido com pHmetro, mantendo-se constante em 5,9, e quando necessário corrigido com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH), ambos a 1M. A fertirrigação das minicepas foi realizada duas vezes por semana no período matutino, com adição de 100 mL de solução nutritiva básica por vaso e molhando somente a parte do substrato para evitar queima das folhas.

Tabela 2 - Composição da solução nutritiva básica para a fertirrigação do minijardim de *Eucalyptus urophylla*.

Table 2 - Composition of the basic nutrient solution for fertigation of mini-garden of *Eucalyptus urophylla*.

Nutriente	Solução Nutritiva (mgL ⁻¹)	Fonte de Macro e Micronutriente	FQ / PM	(mg L ⁻¹)
N-NO ₃ ⁻	60,00	Sulfato de amônio (Merck®)	(NH ₄) ₂ SO ₄ / 132,14	44,57
N-NH ₄ ⁺	30,00	Nitrato de amônio (Reagex®)	NH ₄ NO ₃ / 80,04	140,50
P	12,00	Monoamôniofostato (Mallinckrodt®)	NH ₄ H ₂ PO ₄ / 115,03	44,57
Ca	40,00	Nitrato de cálcio (Labsynth®)	Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O / 236,15	57,18
K	80,00	Cloreto de potássio (Ecibra®)	KCl / 74,56	400,00
S	10,00	Cloreto de cálcio (Synth®)	CaCl ₂ .2H ₂ O / 147,02	111,13
Mg	12,00	Sulfato de magnésio (Mallinckrodt®)	MgSO ₄ .7H ₂ O / 246,48	60,49
B	0,481	Ácido bórico (Ecibra®)	H ₃ BO ₃ / 61,83	2,750
Cu	0,100	Sulfato de cobre (Mallinckrodt®)	CuSO ₄ .5H ₂ O / 249,68	0,3929
Fe	2,00	Sulfato de ferro (Synth®)	FeSO ₄ .7H ₂ O / 278,02	9,9520
Mo	0,02	Molibdato de sódio (Merck®)	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O / 241,95	0,0504
Mn	1,60	Sódio - EDTA (Nuclear®)	Na ₂ -EDTA.2H ₂ O / 372,24	13,31
Zn	0,065	Sulfato de zinco (Mallinckrodt®)	ZnSO ₄ .7H ₂ O / 287,54	0,285

Fonte: Brondani et al. (2012).

O experimento foi conduzido por 18 meses e nesse período foram realizadas quatro coletas de brotações com intervalo entre elas variando de 30 a 55 dias, de acordo com a produtividade de brotações. A 1ª e 4ª coletas foram realizadas nos meses de junho com média de temperatura de 32°C e janeiro com 30°C respectivamente. Já a 2ª e 3ª coletas foram realizadas nos meses de agosto com temperatura média de 36°C e outubro com 35°C respectivamente.

Os brotos foram coletados no período matutino, apresentando comprimento superior a 5 cm e contendo em média 2 pares de folhas. Para as coletas posteriores, foram mantidos nas minicepas brotos com tamanhos inferiores a 3 cm e 2 pares de folhas. Os brotos cortados foram armazenados em caixas de isopor com água destilada visando mitigar as perdas de turgescência celular.

As miniestacas foram cortadas em bisel na região basal utilizando tesoura de poda, com redução da sua área foliar em 50% do tamanho original. Posteriormente, as bases das miniestacas foram imersas em solução hidroalcoólica (1:1, água: álcool, v/v) com concentrações de 0 (isento de AIB) e 1.000 mg L⁻¹ por 10 segundos, para verificar a necessidade da utilização do fitorregulador de crescimento no processo de rizogênese.

As bases das miniestacas foram inseridas de 1 a 2 cm em substrato composto Maxxi® (composição: esterco de aves com calcário, fibra de coco, húmus de minhoca) e arroz carbonizada na proporção (2:1, v/v) em recipientes de polietileno de 100 cm³ no formato quadrangular. Em seguida, foram acondicionadas em casa de vegetação automatizada, com irrigação via nebulização, com temperatura a 35°C e 90% de umidade, onde permaneceram entre 30 e 35 dias. Para a aclimação as miniestacas foram transferidas para cada sombreamento, depois, com sombrite 50%, onde permaneceram de 15 a 25 dias. Por fim, foram levadas à área a pleno sol para um período de rustificação de 30 dias.

Na área de pleno sol as miniestacas receberam fertirrigação da solução nutritiva, com aplicação de 1,5 L/m² da solução de 25%, 75% e 100%, correspondentes aos mesmos tratamentos aplicados nas minicepas. As aplicações foram realizadas durante o período matutino, duas vezes na semana.

Após a rustificação das miniestacas, foram feitas as seguintes avaliações: contagem da quantidade de raiz (un), comprimento da maior raiz (cm), percentual de enraizamento na saída da rustificação (%) e a altura total da miniestaca (cm) utilizando-se régua graduada em centímetro.

Para a análise histológica efetuou-se amostragem da porção basal das miniestacas, com 0 (no corte), 10, 20 e 30 dias de cultivo. As amostras foram fixadas em uma solução de formaldeído e glutaraldeído (KARNOVSKY, 1965) e submetidas a três séries de vácuo por 15 minutos para a remoção de ar. Em seguida, foram desidratadas em solução alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% v/v), permanecendo por 10 minutos. Depois, foram emblocadas em resina de hidroxietil metacrilato (Leica®).

As amostras foram seccionadas a 10 µm com uso do micrótomo rotativo manual acoplado com navalha do tipo C. Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,05%, v/v) em tampão de fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973) e montado lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®). As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas com microscópio de luz em escala micrométrica, sendo as imagens capturadas com câmera digital (Figura 1 A-C).

Figura 1 - Detalhe da miniestaca (a); amostra emblocadas em resina de hidroxietil metacrilato (b); detalhe da lâmina histológica (c).

Figure 1 - Detail of minicuttings (a); sample embedded in hydroxyethyl methacrylate resin (b); detail of the histological slide (c).

O experimento foi conduzido no delineamento bloco casualizado em arranjo fatorial (3x2x4) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por solução nutritiva (S1 – 100%, S2 – 75%, S3 – 25%), AIB (ausência e 1.000 mg.L⁻¹) e por coleta de brotações (4 coletas), com cinco blocos contendo sete miniestacas por parcela.

A análise histológica foi conduzida no delineamento bloco casualizado em arranjo fatorial (3x2x4) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por solução nutritiva (S1 – 25%, S2 – 75%, S3 – 100%), ausência e presença de AIB (ausência e 1.000 mg.L⁻¹) e por quatro tempos de avaliação (0, 10, 20 e 30 dias). Foram selecionadas miniestacas ao longo do experimento a partir do momento de acondicionamento na casa de vegetação. Ao 0 dia e 10 dias foram selecionadas três miniestacas por tratamento, aos 20 e 30 dias cinco miniestacas por tratamento.

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Lilliefors ($p < 0,05$) e homogeneidade de Bartlett ($p < 0,05$) e transformados quando necessário. Em seguida foi realizada a análise de variância ANOVA ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando o software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantidade de raiz

A quantidade de raiz apresentou interação entre solução nutritiva, coleta de brotações e AIB (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados médios para quantidade de raiz de *Eucalyptus urophylla* da 1ª a 4ª coleta em relação à solução nutritiva, coleta de brotações e AIB.

Table 3 - Mean data for amount of *Eucalyptus urophylla* root from the 1st to 4th collection in relation to nutrient solution, sprout collection and IBA.

Coleta	1ª		2ª	
Solução\AIB	S/AIB	C/AIB	S/AIB	C/AIB
100%	3,00 (a,a,b)	6,17 (a,a,a)	1,48 (a,b,a)	0,57 (a,c,a)
75%	3,60 (a,a,a)	3,82 (b,a,a)	1,20 (a,b,a)	1,34 (a,b,a)
25%	4,62 (a,a,a)	2,08 (c,a,b)	1,80 (a,b,a)	1,71 (a,a,a)
Coleta	3ª		4ª	
Solução\AIB	S/AIB	C/AIB	S/AIB	C/AIB
100%	0,42 (c,b,a)	1,37 (a,c,a)	1,99 (a,a,a)	2,72 (a,b,a)
75%	3,65 (a,a,a)	1,62 (a,b,b)	3,22 (a,a,a)	2,75 (a,a,a)
25%	1,94 (b,b,a)	2,17 (a,a,a)	2,37 (a,b,a)	2,21 (a,a,a)

Comparação de média para 3 fatores. Primeira letra indica comparação da solução para cada nível de coleta e AIB. Segunda letra indica a comparação da coleta dentro de cada nível de solução e AIB. Terceira letra indica a comparação do AIB dentro da solução e coleta.

Considerando a ausência de AIB em relação às três concentrações de solução nutritiva apenas a 3ª coleta apresentou diferença significativa, sendo que a solução de 75% a maior média. Com a presença de AIB, a 1ª coleta para a solução de 100% obteve o melhor resultado, diferenciando-se das demais soluções para a quantidade de raiz.

De acordo com as soluções a de 100% sem AIB, para a 1ª e 4ª coleta são iguais estatisticamente, possuindo ambas as maiores médias. Com AIB a 1ª coleta favoreceu o número de raiz.

Na solução de 75% sem AIB, a 1ª, 3ª e 4ª coletas são estatisticamente iguais. Com a presença de regulador somente a 1ª e 4ª coleta apresentaram resultados superiores.

A solução nutritiva 25% sem AIB, a 1ª coleta possui a maior média diferenciando estatisticamente das demais. Com a presença de AIB não houve diferenças significativas.

Em relação às coletas, a 1ª, para solução de 100% com AIB apresentou a maior resultado com média de 6,17 quantidade de raiz por miniestaca. Para solução de 75% não houve diferença significativa em relação ao AIB já a solução de 25% sem AIB apresentou média de 4,62 superior aos 2,08 com o regulador de crescimento. Na 2ª coleta, não houve diferença nas soluções de 100%, 75% e 25% em relação ao AIB. A 3ª coleta apresentou diferença significativa somente para a solução de 75% com AIB e na 4ª coleta, não houve diferença na solução de 100%, 75% e 25% em relação ao AIB.

As maiores médias foram obtidas na utilização de AIB, com valores até 6,17 de raízes por miniestacas o que indica que o regulador de crescimento favorece o aumento na quantidade de raiz.

Resultados encontrados para quantidade de raiz por Souza Junior, Quorin e Wendling (2008) observaram que o tratamento de 1000 mg L⁻¹ obteve média de 2,5 de raízes por miniestacas. Titon et al., (2002), obteve resultados de quantidade de raiz para miniestacas de *Eucalyptus grandis* de 3,0 a 3,5. Estes resultados sugerem que genótipos com potencial rizogênico, de forma geral, apresentaram respostas significativas a utilização de menores dosagens de AIB, independentemente da forma de aplicação. Estudos com clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, apresentou-se pouco diferenciado em resposta à aplicação de 0 a 1.000 mg L⁻¹ de AIB ocorrendo decréscimos a partir dessa dosagem. (GOULART et. al., 2008).

Apesar da pouca diferenciação do AIB no enraizamento, a utilização do regulador de crescimento resulta na renovação da atividade celular das raízes adventícias, as quais se desenvolvem em meristema apical da raiz de maneira análoga a formação de raízes laterais (FETT-NETO et. al., 2005). Assim o AIB atua como agente motivador das concentrações endógenas de auxinas, acelerando o metabolismo a partir de alterações de enzimas, carboidratos, RNA, DNA, proteínas e consequentemente o processo de indução de raízes adventícias (BRONDANI, 2014b).

A quantidade de raízes por estaca é um dado muito importante no enraizamento, uma vez que o vigor das mudas está diretamente relacionado ao tamanho e ao número de raízes (FISCHER, 2008).

Comprimento da Maior Raiz (CMR)

O comprimento da maior raiz foi influenciado pela as soluções nutritivas, coletas de brotações e o regulador de crescimento AIB (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados médios do comprimento da maior raiz de *Eucalyptus urophylla* da 1ª a 4ª coleta em relação à solução nutritiva, coleta de brotações e AIB.

Table 4 - Mean data of the length of the largest *Eucalyptus urophylla* root from the 1st to 4th harvest in relation to the nutrient solution, sprout collection and IBA

Coleta	1ª		2ª	
Solução\AIB	S/AIB	C/AIB	S/AIB	C/AIB
100%	17,22 (a,a,a)	20,57 (a,a,a)	5,15 (a,c,a)	3,17 (a,c,a)
75%	19,65 (a,a,a)	19,04 (a,a,a)	4,02 (a,b,a)	5,70 (a,b,a)
25%	22,26 (a,a,a)	12,80 (b,a,b)	5,68 (a,c,a)	7,84 (a,b,a)
Coleta	3ª		4ª	
Solução\AIB	S/AIB	C/AIB	S/AIB	C/AIB
100%	1,16 (a,c,a)	4,42 (a,c,a)	9,44 (b,b,a)	10,59 (a,b,a)
75%	5,24 (a,b,a)	3,89 (a,b,a)	17,23 (a,a,a)	14,97 (a,a,a)
25%	4,43 (a,c,a)	5,10 (a,b,a)	15,16 (a,b,a)	14,55 (a,a,a)

Comparação de média para 3 fatores. Primeira letra indica comparação da solução para cada nível de coleta e AIB. Segunda letra indica a comparação da coleta dentro de cada nível de solução e AIB. Terceira letra indica a comparação do AIB dentro da solução e coleta.

Relacionando as soluções nutritivas e a ausência de AIB, apenas a 4ª coleta apresentou diferença significativa e as soluções de 25% e 75% foram as que mais favoreceram o comprimento da maior raiz. Com a presença de AIB, solução de 75% e 100% na 1ª coleta apresentaram as maiores médias, diferenciando-se da solução de 25%.

Analisando primeiramente a solução de 100%, os resultados com ausência e presença de AIB, da 1ª coleta foram respectivamente 17,222 e 20,574, diferenciando estatisticamente das demais coletas e favorecendo o crescimento da CMR. A solução de 75% sem e com AIB, apresentaram as maiores médias na 1ª e 4ª coletas. Na solução de 25% sem AIB, a 1ª coleta possui a maior média diferenciando-se das demais e com AIB os melhores resultados para o comprimento da maior raiz ocorreram 1ª e 4ª coletas

Verificando a presença e a ausência de AIB dentro de cada coleta em relação às soluções nutritivas a 2ª, 3ª e 4ª coletas não foram significativas ao CMR, já a 1ª coleta a solução de 25% sem AIB apresentou maior média.

Em relação a 1ª e a 4ª coletas, as médias sem o regulador foram superiores, embora as mesmas não tenham apresentado diferenças estatísticas quando comparadas às miniestacas com AIB. Este resultado pode ter ocorrido, devido ao vigor vegetativo da planta mãe, pois, segundo Cunha et al., (2009a) as auxinas atuam somente na indução das raízes no processo rizogênico, ou seja, no desenvolvimento inicial das raízes. A partir deste momento, no processo de alongamento e crescimento radicial, o boro (B) tem papel fundamental pois facilita o transporte por meio das membranas o que por consequência estimula o crescimento da raiz. Portanto a interação dos fatores nutricionais e o regulador de crescimento favorecem a indução desenvolvimento de raízes auxiliando na formação de um sistema radicial de melhor qualidade.

Enraizamento

A solução nutritiva e as coletas apresentaram diferenças significativas para o enraizamento em todas as coletas. A solução de 25% e de 75% favoreceram o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus urophylla*. Em relação as coletas, a 1ª e a 4ª obtiveram resultados significativos (Figura 2).

Figura 2 - Dados médios do enraizamento de miniestacas para a 1ª a 4ª coleta de broto de *Eucalyptus urophylla* em relação à solução nutritiva (a) e às coletas (b). Médias seguidas por mesma letra não diferenciam estatisticamente entre si significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Figure 2 - Average data of rooting of minicuttings for the 1st to 4th collection of *Eucalyptus urophylla* shoot in relation to nutrient solution (a) and in relation to collections (b). Means followed by the same letter do not statistically differ significantly from each other by the Scott-Knott test at the 5% error probability level.

Cunha et al. (2009b), obteve resultados superiores em clones de eucalipto em relação a solução nutritiva, isto pode ter ocorrido devido as miniestacas originarem-se material seminal. De acordo com o mesmo autor, a nutrição mineral desempenha papel fundamental no enraizamento adventício, entretanto as faixas de concentrações ideais dos nutrientes são específicas para cada genótipo, sendo que cada solução nutritiva deve ser manejada de acordo com as exigências da espécie, resultando no aumento do potencial de enraizamento das miniestacas.

No período de coleta dos dados, foi verificada ampla variação de temperatura principalmente na 2ª e 3ª coletas (meses junho a outubro) que apresentou elevadas temperaturas chegando a atingir 37°C (Tabela 1). Valores baixos para o enraizamento, podem ser explicados em parte pela amplitude de temperatura observada na região onde o experimento foi instalado, especialmente se considerarmos a ausência de estrutura de proteção, visto que as miniestacas encontravam-se em pleno sol na fase de rustificação.

A temperatura, neste caso, assim como a luminosidade, pode influenciar de modo determinante a na emissão de raízes adventícias, como no enraizamento (ALFENAS et al., 2009; HARTMANN et al., 2011; TAIZ; ZEIGER, 2013;). Segundo Cunha et al., (2009a) amplas oscilações térmicas são altamente deletérias ao enraizamento. Essas oscilações juntamente com as altas temperaturas podem explicar os resultados inferiores nas respectivas coletas.

Corrêa e Fett-Neto (2004) observa que a temperatura pode influenciar o enraizamento, atuando principalmente na absorção de nutrientes e no metabolismo. No entanto, uma temperatura excessivamente alta, durante esta fase, estimula o desenvolvimento de gemas laterais antes do aparecimento de raízes (HARTMANN et al., 2011). Entretanto é importante ressaltar que a temperatura não foi estudada de forma isolada.

Outro fator relacionado aos resultados inferiores do enraizamento em relação as 2ª e 3ª coletas podem estar associados as minicepas fornecedoras de proágulos. É comum haver oscilações na produção e no estado fisiológico de miniestacas em relação às coletas, ocorrendo picos de produção seguidos de intenso decréscimo. Isto ocorre em função da necessidade de adaptação inicial das minicepas ao ambiente após a quebra de dominância apical e a poda para indução de brotação (BRONDANI et al., 2014a). Resultados semelhantes foram obtidos por Rosa et. al. (2008) que justificou tal fato devido ao possível estresse causado pela poda das mudas em virtude da primeira coleta, o que afetou o vigor vegetativo das plantas e de suas brotações.

Altura Total

Para altura total das miniestacas, relação significativa com relação as soluções nutritivas, coletas de brotações e o regulador de crescimento AIB favorecendo a altura total das miniestacas (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios para altura total de miniestacas (at) de *Eucalyptus urophylla* da 1ª a 4ª coleta de broto em relação à solução nutritiva, coleta de brotações e AIB.

Table 5 - Mean values for total height of minicuttings (at) of *Eucalyptus urophylla* from 1st to 4th bud collection in relation to nutrient solution, sprout collection and IBA.

Coleta	1ª		2ª	
Solução\AIB	S/AIB	C/AIB	S/AIB	C/AIB
100%	29,74 (a,a,a)	34,28 (a,a,a)	10,99 (a,b,a)	7,68 (a,b,a)
75%	33,60 (a,a,a)	30,35 (a,a,a)	7,46 (a,c,a)	10,24 (a,b,a)
25%	34,34 (a,a,a)	20,36 (b,a,b)	11,60 (a,c,a)	13,02 (a,b,a)
Coleta	3ª		4ª	
Solução\AIB	S/AIB	C/AIB	S/AIB	C/AIB
100%	5,37 (b,c,a)	10,59 (a,b,a)	15,25 (b,b,a)	15,37 (a,b,a)
75%	12,69 (a,b,a)	8,95 (a,b,a)	26,01 (a,a,a)	21,43 (a,a,a)
25%	10,64 (a,c,a)	11,08 (a,b,a)	24,32 (a,b,a)	22,18 (a,a,a)

Comparação de média para 3 fatores. Primeira letra indica comparação da solução para cada nível de coleta e AIB. Segunda letra indica a comparação da coleta dentro de cada nível de solução e AIB. Terceira letra indica a comparação do AIB dentro da solução e coleta.

Relacionando as soluções nutritivas e a ausência de AIB, somente as 3ª e 4ª coletas apresentaram diferenças significativas, sendo que a solução de 100% com as menores médias para ambas. Com a presença de AIB, somente a 4ª coleta se diferenciou das demais para a soluções de 100 e 75% com as melhores médias.

Analisando cada solução a de 100% e 75% apresentaram maiores médias para a 1ª coleta independentemente da aplicação de AIB favorecendo a altura total das miniestacas. Já a solução de 25% sem AIB somente a 1ª coleta obteve média significativa e com AIB a 1ª e 4ª coletas resultaram nas maiores médias.

Verificando a presença e a ausência de AIB dentro de cada coleta em relação às soluções nutritivas a 2ª, 3ª e 4ª coletas não foram significativas ao AT, já a 1ª coleta a solução de 25% sem AIB apresentou maior média. Goulart et al. (2008) apresentaram resultados com *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* onde as doses 500 mg L⁻¹ a 2000 mg L⁻¹ foram os mais eficientes para os clones estudados em relação altura das miniestacas.

Os resultados do experimento demonstram que as soluções nutritivas de forma geral, influenciam diretamente no processo rizogênico, no desenvolvimento e qualidade do sistema radicular e no vigor das plantas fornecedoras de propágulos vegetativos. Esses resultados condizem com a literatura, que afirma que plantas fornecedoras de propágulo bem nutridas fornecerão miniestacas com maior disposição ao enraizamento, com melhor qualidade de mudas e de sistema radicular (OLIVEIRA et al., 2012).

Em relação as coletas, os fatores ambientais como luz, temperatura, umidade e o tempo da coleta também têm papel preponderante na rizogênese em *Eucalyptus* (OLIVEIRA et al., 2012). Entretanto altas temperaturas podem ser prejudiciais no desenvolvimento radicular das minestacas.

A aplicação de auxinas exógenas no estudo favoreceu o desenvolvimento do sistema radicular com maior percentagem, qualidade, velocidade, uniformidade no enraizamento.

Histologia

Nas análises anatômicas das miniestacas aos 0 dias, observou-se disposição normal do córtex, câmbio vascular, vasos condutores e a presença de ductos condutores subepidérmicos (Figura 3 A-F).

Aos 10 dias de cultivo em casa de vegetação, somente para a solução de 100% AIB, percebe-se a formação de centros meristemáticos junto ao câmbio vascular. No tratamento com presença do regulador de crescimento verificou-se formação endógena de primórdios radiculares a partir do câmbio vascular, com progressão de formação dos primórdios do ápice radicial e indução de raiz adventícia (Figura 3 G-L). Aos 20 dias, inicia-se a formação dos centros meristemáticos junto ao câmbio para os tratamentos com solução de 25% e 75% (Figura 3 M-R). Ao fim dos 30 dias ocorreu indução de raiz adventícia mediante a emergência e o alongamento dos mesmos apresentando conexão com o câmbio vascular para todos os tratamentos (Figura 3 S-X).

A histologia das miniestacas enraizadas no estudo aponta conexão direta com o câmbio vascular sem a presença de calo, o que corresponde alta qualidade na formação de raízes adventícias e em todo o sistema radicular de forma geral. Segundo Oliveira (2014) raízes adventícias formadas a partir

Figura 3 - Histologia do enraizamento em miniestacas de *Eucalyptus urophylla*. Corte transversal da região do caule após o tratamento com solução nutritiva e AIB, 0 dias (A-F); corte transversal da região do caule tratada com solução nutritiva e AIB conexão do câmbio vascular e indução da raiz adventícia (seta), 10 dias; (G-L) corte transversal da região do caule tratada com solução nutritiva e AIB, apresentando formação de centros meristemáticos junto ao câmbio vascular e indução de raiz adventícia (seta), 20 dias (M-R); corte transversal da região do caule tratada com solução nutritiva e AIB, apresentando expressão da raiz adventícia (setas), 30 dias (S-X). Barra: 100µm.

Figure 3 - Histology of rooting in minicuttings of *Eucalyptus urophylla*. cross section of stem region after treatment with nutrient solution and AIB, 0 days (A-F); cross section of stem region treated with nutrient solution and IBA vascular mechanism connection and adventitious root induction (arrow), 10 days (G-L); cross section of the stem region treated with nutrient solution and IBA, presenting formation of meristematic centers next to the vascular exchange and adventitious root induction (arrow), 20 days (M-R); cross section of the stem region treated with nutrient solution and IBA, presenting adventitious root expression. (arrows), 30 dayS (S-X). Bar: 100µm.

de uma conexão direta com o câmbio vascular permite a formação de uma muda de alta qualidade e com sistema radicular adequado o que promove uma melhor absorção de água e nutrientes.

Resultados semelhantes foram observados por Oliveira (2014) onde as análises histológicas apontaram formação de centros meristemáticos junto ao câmbio vascular e a raiz adventícia formou-se em conexão direta ao câmbio em *Eucalyptus cloeziana*.

A aplicação de auxinas na base das miniestacas tem auxiliado no sucesso do enraizamento de diversas espécies florestais, influenciando na sobrevivência das miniestacas e aumento no índice de enraizamento (HARTMANN et al., 2011; SCHWAMBACH et al., 2005; WENDLING et al., 2010).

Neste sentido resultados semelhantes foram observados por Brondani et al. (2012) em estudos com clones de *Eucalyptus benthamii* que encontraram resultados positivos na aplicação de AIB na indução de raízes, sendo que a concentração de 2.000 mg L⁻¹ promoveu maior velocidade e porcentagem de enraizamento de acordo com as análises histológicas aos 21 dias.

Tal resultado pode ter ocorrido devido à interação na aplicação do regulador de crescimento com as concentrações de soluções nutritivas, pois aos 10 dias de cultivo em casa de vegetação, já era possível verificar o início da indução de raiz adventícia para a solução de 100% com aplicação de AIB.

Os resultados obtidos no presente trabalho, apontam a necessidade de maiores estudos sobre a influência desses fatores na formação de raízes adventícias em *Eucalyptus urophylla* e portanto, otimizar as condições necessárias para o sucesso na propagação de genótipos da espécie.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados e nas condições em que foram realizados os estudos, conclui-se que a interação de soluções nutritivas de 75% e 100%, com concentração de 1000 mg L⁻¹ de AIB e coletas de brotações influenciam na melhoria do enraizamento adventício de miniestacas *Eucalyptus urophylla*, resultando em alternativas eficazes para produção de mudas.

As análises histológicas da rizogênese, permitiram verificar a formação de centros meristemáticos e a inserção da raiz adventícia ao caule a partir de conexão direta com o câmbio vascular, o que confere qualidade do sistema radicular.

1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, G. B.; RIBAS, L. L. F.; HIGA, A. R.; RIBAS, K. C.Z. Efeitos do ácido indolilbutírico (AIB) e da coleta de brotações em diferentes estações do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. **Scientia Forestalis**. Piracicaba, v. 36, n. 78, p. 151-156, 2008.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa: Editora UFV. 2009. 500 p.

ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M.; PAIVA, H. N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p.455-463, 2007.

BRONDANI, G.E., BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N., ALMEIDA, M. Nutritional content in *Eucalyptus benthamii* mini-stump leaves. **Acta Scientiarum**. Agronomy. Maringá, v. 36, n. 4, p. 465-474, 2014a.

BRONDANI, G.E., BACCARIN, F. J. B., BERGONCI, T., GONÇALVES, A. N., ALMEIDA, M. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii*: efeito do genótipo, AIB, zinco, boro e coletas de brotações. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 1, p. 147-156, 2014b.

BRONDANI G. E.; BACCARIN, F. J. B.; ONDAS, H. W. W.; STAPE, J. L.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. **Journal of Forestry Research**, 23(4): 583–592, 2012.

CORRÊA, L. R.; FETT-NETO, A. G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Thermal Biology**, v. 29, p. 315-324, 2004.

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N.; XAVIER, A.; OTONI, W. Papel da nutrição mineral na formação de raízes adventícias em plantas lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 35-47, 2009a.

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N.; LEITE, H. G.; BARROS, N. F.; LEITE, F. P. Influência do estado nutricional de minicepas no enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 607– 615, 2009b.

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

FETT-NETO, A. G.; FETT, J. P.; GOULART, L. W. V.; PASQUALI, G.; TERMIGNONI, R. R.; FERREIRA, A.G. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiol.**, v. 21, p. 457-464, 2001.

FISCHER, D. L. O.; JOSÉ CARLOS FACHINELLO, J. C.; ANTUNES, L. E. C.; TOMAZ, Z. F. P.; GIACOBBO, C. L. Efeito do ácido indolbutírico e da cultivar do enraizamento de estacas lenhosas de mirtilo. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 285-289, 2008.

FRASSETTO, E.G.; FRANCO, E. T. H.; KIELSE, P.; AMARAL, V. F. M. Enraizamento de estacas de *Sebastiania chottiana* Müll. Arg. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n. 12, 2010.

GOULART, P. B.; XAVIER, A.; IAREMA, L.; OTONI, W. C. Morfoanatomia da rizogênese adventícia em miniestacas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 521-532, 2014.

GOULART, P. B.; XAVIER, A.; CARDOSO, N. Z. Efeito dos Reguladores de Crescimento AIB E ANA no Enraizamento de Miniestacas de Clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1051-1058, 2008.

- HARTMANN, H. T.; KESTER, D.vE.; DAVIES JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8 ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915 p.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137–138, 1965.
- KEVERS, C.; HAUSMAN, J. F.; FAIVRE-RAMPANTM O.; EVERS, D. Hormonal control of adventitious rooting progress and questions. **Angewandte Botanik**, v. 71-79, 1997.
- OLIVEIRA, L. S. **Propagação de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell.** 2014. 144 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; DIAS, P. C.; CORREIA, A. C. G.; BORGES, S. R.; TAKAHASHI, E. K.; PAIVA, H. N. .Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. **Scientia Forestalis**, v. 40, p. 507-516, 2012.
- SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Biotechnic and Histochemistry**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.
- SCHWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A.G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 487–494, 2005.
- SEIN, C. C.; MITLOHNER, R. ***Eucalyptus urophylla* S.T. Blake Ecology and silviculture in Vietnam**. Bogor: CIFOR, 2011. 26 p.
- SOUZA JUNIOR, L.; QUOIRIN, M.; WENDLING, I. Miniestaquia de *Grevillea robusta* A. Cunn. à partir de propágulos juvenis. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 4, p. 455-460, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.
- TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 665-673, 2002.
- WENDLING, I.; DUTRA, L.F. **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 184 p.

Recebido em: 23/10/2017

Aceito em: 20/11/2018