

IVAR WENDLING

REJUVENESCIMENTO DE CLONES DE *Eucalyptus grandis* POR MINIESTAQUIA  
SERIADA E MICROPROPAGAÇÃO

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Florestal, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2002

IVAR WENDLING

REJUVENESCIMENTO DE CLONES DE *Eucalyptus grandis* POR MINIESTAQUIA  
SERIADA E MICROPROPAGAÇÃO

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Florestal, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2002.

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Conselheiro)

---

Prof. Haroldo Nogueira de Paiva  
(Conselheiro)

---

Eng. Florestal Fernando Grossi

---

Prof<sup>ª</sup> Rita de Cássia Gonçalves Borges

---

Prof. Aloisio Xavier  
(Orientador)

## AGRADECIMENTO

Aos meus pais Paulo e Hedi, eternos apoiadores das minhas decisões, por não terem medido esforços para a minha formação.

À minha irmã Márcia, pelo sempre valioso apoio, e à minha sobrinha Júlia Luisa, pela sua existência, alegria e naturalidade de encarar a vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Programa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Federação das Indústrias de Minas Gerais (FIEMG), pela bolsa de estudo.

À Celulose Nipo-brasileira S.A. (CENIBRA), em especial ao engenheiro David Fernandes, pela disponibilização do material experimental e pelo apoio orçamentário e estrutural na condução das pesquisas.

Ao meu orientador e amigo professor Aloisio Xavier, incansável educador e pesquisador, pela oportunidade de convivência, pela orientação geral, pelos ensinamentos, pelas críticas e pelas sugestões.

Ao professor José Mauro Gomes, pela grande amizade, pelo companheirismo e pelas sugestões de vida, que me possibilitaram chegar até aqui.

Aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões.

Ao meu grande amigo de graduação, mestrado e doutorado Alcides Gatto, pelas peleias e oportunidade de convivência em república e pelo apoio durante essas jornadas.

Aos funcionários da CENIBRA, em especial aos engenheiros Sérgio Borenstein e Gilbert Ferrari, ao técnico Flávio Luis Souza e aos funcionários Fatinha, Maria, Neneco, Rozimar, Salim, Zé Antônio, Valmir e Vander, pelo importante auxílio na condução das pesquisas e pela alegre convivência.

Ao professor Eduardo Euclides Borges, pela importante orientação durante a realização das análises bioquímicas, e aos funcionários do Laboratório de Silvicultura Mauro e Gilberto, pelo grande auxílio na condução das análises.

Aos meus amigos e colegas de república Leonardo Coutinho Senra, Renato (baiano) e Roberto Carlos Orlando, pela oportunidade de convivência.

Aos meus amigos Agostinho, Ademir, Beno, Elena, Elson, Gilmar, Gislaine, Júlio, Lília, Luciano, Maira, Marlice, Roselir, Valdir e Valmir (La Planta).

À Lídia, que, com sua simplicidade e honestidade, sempre me proporcionou bons consolos e conselhos.

Aos participantes do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Silvicultura Clonal (GSC) Alex, Elisa, Fabiana, Glêison, Marcelo, Miranda, Rogério e Rodrigo, pela oportunidade de convivência e trabalho em equipe.

Aos meus colegas do DEF, em especial a Kellen, Moisés, Marcelo Müller, Rogério, Aderbal, Sukita, Zé Humberto, Bertola e Urbano, pelo companheirismo e pela agradável convivência durante a realização do Programa.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II (BIOAGRO), pelo importante auxílio na condução das pesquisas e pela adorável convivência.

Aos membros da Grande Família Wendling, pela alegria, sinceridade e simplicidade.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pelo apoio e pela minha liberação para o término do Programa de Doutorado.

Ao povo de Viçosa, pela acolhida.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

IVAR WENDLING, filho de Paulo Wendling e Hedi Grasel Wendling, nasceu em 25 de janeiro de 1973, em Itapiranga, Estado de Santa Catarina.

Em 1987, concluiu o primeiro grau na Escola Básica Pe. Teodoro Treis, em São João do Oeste, SC.

Em 1990, concluiu o Curso de Técnico em Agropecuária no Colégio Agrícola São José, em Itapiranga, SC.

Em 1996, diplomou-se Engenheiro Florestal pela Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS.

Em março de 1997, ingressou no Curso de Mestrado em Ciência Florestal, Área de Concentração em Propagação de Plantas, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, defendendo tese em março de 1999.

Em março de 1999, ingressou no Curso de Doutorado em Ciência Florestal, Área de Concentração em Silvicultura Clonal, na UFV, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2002.

Em outubro de 2001, ingressou no quadro de pesquisadores da EMBRAPA, atuando na Embrapa Florestas, em Colombo, PR.

## ÍNDICE

RESUMO .....	Página
ABSTRACT .....	viii
	x

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1. Propagação vegetativa de <i>Eucalyptus</i> .....	5
2.2. Juvenilidade e maturação em plantas .....	6
2.2.1. Hábito e vigor de crescimento .....	7
2.2.2. Crescimento em diâmetro e altura .....	8
2.2.3. Alterações bioquímicas .....	9
2.2.4. Capacidade de enraizamento e vigor radicular .....	10
2.3. Rejuvenescimento de plantas .....	11
2.3.1. Rejuvenescimento por micropropagação seriada .....	12
2.3.2. Rejuvenescimento por enxertia seriada .....	13
2.3.3. Rejuvenescimento por estaquia seriada .....	14
2.3.4. Rejuvenescimento por podas drásticas .....	15
2.3.5. Outras práticas de rejuvenescimento .....	15
2.4. Indicadores bioquímicos do potencial rizogênico dos propágulos .	16
2.4.1. Peroxidases .....	Página 16
2.4.2. Compostos fenólicos .....	17
2.4.3. Carboidratos e nitrogênio total .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1. Material experimental .....	20
3.2. Metodologia de rejuvenescimento .....	21
3.2.1. Rejuvenescimento por miniestaquia seriada .....	21
3.2.2. Rejuvenescimento por micropropagação seriada .....	22
3.2.3. Instalação dos experimentos .....	23
3.2.4. Manejo nutricional e hídrico dos jardins clonais .....	23
3.3. Condução e avaliações experimentais .....	25
3.3.1. Enraizamento das mini e microestacas .....	25
3.3.2. Avaliações: miniestaquia seriada .....	26
3.3.3. Avaliações: miniestaquia seriada x micropropagação .....	26
3.3.4. Avaliações: efeito hormonal .....	27

3.4. Análises bioquímicas .....	27
3.4.1. Atividade da enzima peroxidase .....	28
3.4.2. Teor de fenóis totais .....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
4.1. Rejuvenescimento: miniestaquia seriada .....	30
4.1.1. Sobrevivência e produção das minicepas .....	30
4.1.2. Vigor das minicepas .....	34
4.1.3. Vigor radicular no enraizamento de miniestacas .....	37
4.1.3.1. Análise de variância .....	37
4.1.3.2. Número de raízes .....	39
4.1.3.3. Comprimento da maior raiz .....	41
4.1.3.4. Comprimento total de raízes .....	41
4.1.3.5. Peso da matéria seca da parte radicular .....	44
4.1.4. Enraizamento, sobrevivência e vigor das miniestacas .....	46
4.1.4.1. Análise de variância .....	46
4.1.4.2. Enraizamento e sobrevivência das miniestacas .....	47
4.1.4.3. Altura e diâmetro de colo .....	50
4.1.5. Peso da matéria seca das partes aérea e radicular .....	52
4.2. Rejuvenescimento: miniestaquia seriada x micropropagação .....	53
4.2.1. Vigor das mini e microcepas .....	53
4.2.2. Vigor radicular no enraizamento das mini e microestacas .....	56
4.2.3. Enraizamento, sobrevivência e vigor das mini e microestacas .....	61
4.2.3.1. Análise de variância .....	61
4.2.3.2. Enraizamento e sobrevivência das mini e microestacas .....	62
4.2.3.3. Altura e diâmetro de colo .....	65
4.3. Rejuvenescimento: reguladores de crescimento para enraizamento .....	67
4.3.1. Análise de variância .....	67
4.3.2. Enraizamento e sobrevivência das miniestacas .....	67
4.3.3. Altura e diâmetro de colo .....	73
4.3.4. Peso da matéria seca da parte aérea .....	77

Página

4.3.5. Peso da matéria seca da parte radicular .....	79
4.4. Rejuvenescimento: peroxidase e teor de fenóis totais .....	81
5. CONCLUSÕES .....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
APÊNDICE .....	97
APÊNDICE A .....	98



## RESUMO

WENDLING, Ivar, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002.

**Rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação.** Orientador: Aloisio Xavier. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Haroldo Nogueira de Paiva.

O presente estudo objetivou avaliar a influência dos subcultivos de miniestaquia seriada no rejuvenescimento de quatro clones de *Eucalyptus grandis* quanto: a) a capacidade de produção, vigor e sobrevivência das minicepas, bem como quanto a sobrevivência, enraizamento e vigor das miniestacas; b) à eficiência do rejuvenescimento pela miniestaquia seriada em relação à micropropagação; c) ao efeito da aplicação de diferentes dosagens do regulador de crescimento AIB (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>) no enraizamento de miniestacas oriundas de diferentes subcultivos de miniestaquia seriada; e d) à existência de indicadores bioquímicos do potencial rizogênico de miniestacas de diferentes subcultivos de miniestaquia seriada. Para os jardins miniclonais, foram utilizadas minicepas resultantes do enraizamento sucessivo das miniestacas obtidas pela miniestaquia, sendo o jardim microclonal constituído de microcepas oriundas de mudas rejuvenescidas mediante 10 subcultivos *in vitro*. Para o enraizamento, as mini e microestacas permaneceram 25 dias em casa de vegetação e, para aclimação, 10 dias em casa de sombra. A avaliação final das mudas foi realizada aos 50 dias de idade a pleno sol. De modo geral, a sobrevivência das mini e microcepas foi superior a 96% após sete coletas, tendo a produção de miniestacas variado de 5,1 a 6,3 miniestacas por minicepa por coleta e o vigor das minicepas apresentou tendência de diminuição com o maior número de subcultivos. Em geral, observou-se efeito significativo positivo da miniestaquia seriada sobre a sobrevivência, a altura e o diâmetro de colo das mudas, bem como sobre o vigor radicular em clones com menor grau de juvenildade. Quanto à comparação da miniestaquia seriada com a micropropagação, foram observados resultados semelhantes, indicando o potencial da miniestaquia seriada como método de rejuvenescimento dos clones de *Eucalyptus grandis* estudados. A aplicação de AIB não resultou em aumento no enraizamento e sobrevivência das miniestacas, bem como no vigor geral das mudas originárias destas, sendo para algumas características e clones observada influência negativa das dosagens acima de 500 mg L<sup>-1</sup>. A atividade total da enzima peroxidase tendeu a diminuir com o

aumento dos subcultivos de miniestaquia seriada para os clones de menor enraizamento, não tendo havido nenhum efeito naqueles de maior enraizamento. Quanto ao teor de fenóis totais, não se observou tendência de variação em relação aos clones e subcultivos estudados.

## ABSTRACT

WENDLING, Ivar, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February of 2002.  
***Eucalyptus grandis* clone rejuvenation by serial minicutting and micropropagation.** Adviser: Aloisio Xavier. Committee members: Wagner Campos Otoni and Haroldo Nogueira de Paiva.

The objective of this study was to evaluate the influence of subcultures from serial minicutting **technique** on the rejuvenation of four *Eucalyptus grandis* clones in relation to: a) production capacity, vigor and survival of the ministumps, as well as survival, rooting and vigor of the minicuts; b) the efficiency of rejuvenation by serial minicutting technique in relation to micropropagation; c) the application effect of growth regulator IBA in different dosages (0, 500, 1,500 and 3,000 mg L<sup>-1</sup>) on the rooting of minicuts originated from different subcultures of serial minicutting technique; and d) the existence of biochemical indicators for the rhizogenic potential in minicuts from different subcultures of serial minicutting technique. For miniclonal gardens, ministumps were used which had been brought forth by successive rooting of minicuts obtained by minicutting technique, so that the microclonal garden consisted in ministumps originated from microcutting rejuvenated by 10 subcultures *in vitro*. For rooting, the mini- and microcutting were kept in a greenhouse for 25 days and for acclimatization in a shade house during 10 days. The final evaluation of the minicuts was carried out when the plants were 50 days old, under full sunshine. In general, the survival of the mini- and ministumps was above 96% after seven harvests. The minicut production varied from 5.1 to 6.3 per ministump per harvest and the vigor of the ministumps presented a sinking tendency when the number of subcultures was increased. Generally, a significant positive effect of serial minicutting technique on survival, height and root collar diameter as well as on the radical vigor in clones with lower juvenility degrees was observed. In relation to the comparison of serial minicutting technique with micropropagation, similar results were observed, thus suggesting the potential of serial minicutting technique as a rejuvenation method for the studied clones in *Eucalyptus grandis*. The application of IBA did not result in increases for rooting or survival of the minicuts, nor in the general vigor of the minicuts they brought forth. For some characteristics and clones, negative influence of dosages above

500 mg L<sup>-1</sup> was observed. The total activity of the peroxidase enzyme tended to diminish with the increase of subcultures from serial minicutting technique for the clones with lower rooting, and produced no effect at all on those with higher rooting. In relation to the content of total phenols, no variation tendency was observed in relation to the studied clones and subcultures.

## 1. INTRODUÇÃO

A silvicultura clonal tem como ponto de partida a seleção de genótipos superiores para, posteriormente, proceder-se à sua propagação clonal massal. Baseado nessas constatações e visto que o processo de seleção desses genótipos ocorre basicamente na fase adulta, o enraizamento de propágulos vegetativos e a formação de mudas com alto vigor de plantas constituem um grande desafio.

Assim, a maturação do material vegetal, decorrente da transição da fase juvenil para a adulta, tem recebido atenção especial em plantas lenhosas devido às alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que determinam a resposta dos propágulos vegetativos às condições do ambiente de propagação e, posteriormente, ao ambiente de crescimento dos povoamentos florestais. No entanto, essas alterações nas plantas, em virtude da transição do estado juvenil para o adulto, são variáveis entre as diferentes espécies e, mesmo para uma mesma espécie, as informações são contraditórias (HACKETT, 1987a).

Na classificação de um material quanto ao seu gradiente de juvenilidade e, ou, maturidade, torna-se necessário o estabelecimento de marcadores morfológicos, bioquímicos e fisiológicos confiáveis, que possam prever a obtenção de um nível de juvenilidade suficiente para se iniciar a propagação clonal com eficiência.

Diversos autores tentaram relacionar características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas como marcadores do estado de maturidade e, ou, juvenilidade de determinada célula, órgão ou tecido da planta (CLAIR et al., 1985; HACKETT, 1987a; HUANG et al., 1990; GREENWOOD, 1992; HACKETT e MURRAY, 1993).

Entre as características morfológicas, podem ser citados o hábito de crescimento, a anatomia foliar e caulinar e o crescimento em diâmetro e altura, entre outros; as características fisiológicas, como a atividade fotossintética, a capacidade de

enraizamento e a competência reprodutiva, entre outros; e as características bioquímicas, como os teores de etileno, ABA, auxinas, citocininas, giberelinas, cofatores de enraizamento, certas enzimas, clorofila e antocianina, entre outros. Porém, os resultados obtidos são muito escassos, restritos principalmente a algumas espécies de clima temperado e, ou, espécies de clima tropical em condições temperadas.

A compreensão dos mecanismos relacionados à maturação é fundamental para a efetiva manipulação das fases de desenvolvimento (HUANG et al., 1990), e, segundo GREENWOOD (1992), a sua regulação em plantas é um processo ainda não elucidado, principalmente em espécies lenhosas, em que há carência de informação descritiva a esse respeito.

O rejuvenescimento pode ser considerado uma forma de reverter as plantas do estado maduro para o juvenil. Segundo GONÇALVES (1982), existem vários métodos para manter ou reverter a juvenilidade das plantas: tratamento térmico, tratamento com raios X, aplicação de ácido giberélico, propagação vegetativa seriada, poda drástica ou poda de gemas apicais, neodiferenciação de gemas, apomixia e meiose para células. Entre os mais utilizados, podem-se citar a propagação vegetativa seriada (HACKETT, 1987b; ELDRIDGE et al., 1994) e as podas sucessivas (HACKETT, 1987b; ELDRIDGE et al., 1994).

Dentre esses métodos, o rejuvenescimento por propagação vegetativa seriada consiste em micropropagar, enxertar ou estaquear, sucessivamente, propágulos adultos até que se obtenha seu rejuvenescimento (ELDRIDGE et al., 1994).

Vários autores citaram que as características relacionadas à maturação podem ser modificadas por meio da micropropagação seriada (GONÇALVES, 1982; HACKETT, 1987b; BONGA e VON ADERKAS, 1992; GEORGE, 1993). Para *Eucalyptus* spp., a literatura tem mostrado que o potencial de enraizamento dos propágulos de árvores maduras aumenta com os sucessivos subcultivos *in vitro* (CHAPERON, 1987; HACKETT, 1987b; XAVIER e COMÉRIO, 1997).

A enxertia sucessiva de brotações adultas em porta-enxertos juvenis é um método de rejuvenescimento caro, demanda muito tempo (ELDRIDGE et al., 1994) e apresenta problemas de incompatibilidade (KIM et al., 1993), porém tem grandes aplicações na área florestal, principalmente em espécies do gênero *Pinus*.

O efeito da estaquia seriada sobre o rejuvenescimento em *Eucalyptus* spp., resultando em possíveis efeitos positivos sobre o enraizamento, foi citado por ELDRIDGE et al. (1994) e em alguns trabalhos desenvolvidos, nessa linha, por CLAIR et al. (1985) com *Picea abies*; entretanto, ainda há carência de informações consistentes em relação a esses aspectos. Dentro dessa mesma filosofia de trabalho, a miniestaquia seriada poderá vir a ser um método alternativo promissor no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*, em vista de ser uma técnica nova, já embutida nos programas de propagação clonal massal na maioria das empresas florestais brasileiras, bem como pela rapidez no enraizamento e formação das mudas. Aliado a isso, a baixa necessidade de recursos financeiros e estruturais para implementação de um programa de rejuvenescimento pela miniestaquia seriada torna-a uma ferramenta de grande interesse para tais objetivos.

Em detrimento dessas colocações e em razão do atual escasso conhecimento disponível em relação aos aspectos inerentes ao gradiente de juvenilidade e, ou, maturidade, aliado ao recente desenvolvimento da técnica de miniestaquia, tornam-se imprescindíveis estudos nessa linha do conhecimento.

Assim, com base em quatro clones de *Eucalyptus grandis*, o presente estudo objetivou avaliar:

- 1) A influência dos subcultivos de miniestaquia seriada na capacidade de produção, vigor e sobrevivência das minicepas, bem como na sobrevivência, enraizamento e vigor das miniestacas.
- 2) A eficiência do rejuvenescimento pela miniestaquia seriada em relação à micropropagação.
- 3) O efeito do regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de miniestacas oriundas de diferentes subcultivos de miniestaquia seriada.
- 4) A existência de indicadores bioquímicos (atividade total de peroxidase e teor de fenóis totais) do potencial rizogênico de miniestacas rejuvenescidas pela miniestaquia seriada.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*

A propagação vegetativa de *Eucalyptus* no Brasil passou por inúmeras transformações, tendo iniciado com a implementação da técnica de estaquia, em escala comercial, em meados da década de 70 (IKEMORI, 1975).

Devido às dificuldades encontradas na propagação vegetativa de algumas espécies e clones, principalmente no que envolve material adulto e variação entre genótipos (ASSIS, 1997), a técnica de micropropagação surgiu com grande potencialidade na década de 80 (BONGA e VON ADERKAS, 1992). Entretanto, o uso da micropropagação na produção comercial de mudas de *Eucalyptus* ainda não se justificou técnica e economicamente, sendo mais recomendada com vistas ao rejuvenescimento de material adulto, visando à microestaquia (XAVIER e COMÉRIO, 1996).

O fato de a microestaquia depender de laboratório de cultura de tecidos para promover o rejuvenescimento dos clones selecionados limitou a implementação desta técnica na maioria das empresas florestais. Assim, nos últimos anos, a miniestaquia tornou-se uma técnica atraente na clonagem do *Eucalyptus*, em que a maioria das médias e grandes empresas florestais brasileiras já a implantou em nível comercial.

A alternativa da miniestaquia em substituição à microestaquia pode ser considerada uma boa estratégia, uma vez que não necessita de estruturas de laboratórios de cultura de tecidos, reduzindo, portanto, o custo na produção das mudas (XAVIER e WENDLING, 1998). Contudo, segundo esses mesmos autores, torna-se necessário avaliar qual a melhor estratégia de propagação a ser adotada, pois cada técnica apresenta vantagens e desvantagens, e, para o caso de clones de fácil propagação vegetativa, procedimentos mais simples e de menor custo, como a miniestaquia, podem ser suficientes para atender ao processo de produção massal de mudas de *Eucalyptus*.



## 2.2. Juvenildade e maturação em plantas

O ciclo de vida de muitas plantas se relaciona às fases juvenil e adulta, nas quais as características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas são diferentes. Após a germinação da semente, a planta inicia uma fase de crescimento vegetativo muito vigoroso, durante a qual a iniciação floral e a floração não podem ser induzidas, mesmo que as condições externas sejam favoráveis (SALISBURY e ROSS, 1978).

As mudanças ocorridas em razão da troca de fase com o desenvolvimento da planta variam de espécie para espécie, e as maiores alterações precedem à maturação, resultando em formas transicionais (HACKETT e MURRAY, 1993). Segundo estes autores, as características relacionadas à maturação são estáveis e reversíveis, porém não apresentam o mesmo grau de facilidade na reversão, e essa facilidade de reversão para determinada característica varia em decorrência do nível de juvenildade.

Em algumas espécies, especialmente nas lenhosas, há um gradiente de juvenildade em direção à base da árvore (ZOBEL e TALBERT, 1984; ELDRIDGE et al., 1994), sendo ele variável entre espécies (HACKETT, 1987a), o que promove aumento da maturação em razão da maior proximidade com o meristema apical (GREENWOOD e HUTCHISON, 1993). A maior juvenildade da região basal das plantas se deve ao fato de que os meristemas mais próximos da base formaram-se em épocas mais próximas à germinação que o das regiões terminais (HARTMANN et al., 1997).

Estudos têm evidenciado que algumas características, como a filotaxia, a forma e retenção das folhas, a presença de espinhos e a pigmentação, que estão associadas com a juvenildade, são mantidas nas porções basais de plantas adultas de muitas espécies (HACKETT, 1987a). Similarmente, brotações laterais mais distantes do ramo ou caule central apresentam menores graus de juvenildade do que aqueles mais próximos (HUANG et al., 1990). Tais resultados têm sido usados como evidências para dar suporte à hipótese de que a maturação tem bases celulares (HARTMANN et al., 1997), sendo o estado de maturação função de divisões celulares cumulativas (GREENWOOD e HUTCHISON, 1993).

Várias são as características que sofrem modificações com a troca de fase durante o desenvolvimento das plantas. Essas modificações relatadas em literatura são, em sua maioria, somente citações, sem o devido e necessário rigor científico nas suas avaliações. Desse modo, nos tópicos subseqüentes são descritas as principais alterações decorrentes da transição de fase, com base em resultados de pesquisas científicas.

### 2.2.1. Hábito e vigor de crescimento

O crescimento plagiotrópico refere-se à situação em que algumas plantas propagadas vegetativamente assumem um crescimento desviado da vertical (ortotropia) e continuam seu crescimento de forma similar a uma ramificação lateral (crescimento plagiotrópico) (ZOBEL e TALBERT, 1984).

Segundo dados experimentais de GREENWOOD e HUTCHISON (1993) e PARKER et al. (1998), árvores originadas por enxertia ou enraizamento de estacas de propágulos juvenis de *Tsugar canadensis* e *Pinus taeda* tendem a exibir maior número de brotações por unidade de área, bem como maior tendência ao crescimento ortotrópico, em comparação com aquelas de propágulos maduros.

Em araucária e café, mudas produzidas por enraizamento de estacas coletadas de brotações laterais continuam tendo crescimento plagiotrópico, enquanto estacas

coletadas de brotações da parte apical se desenvolvem normalmente (HARTMANN et al., 1997), sendo a mesma resposta encontrada em *Platanus occidentalis* (LAND et al., 1995).

Para espécies do gênero *Eucalyptus*, não foram encontrados estudos referentes aos efeitos de gradientes de maturidade dos propágulos utilizados na propagação. Porém, em níveis de viveiro e campo, podem-se observar plantas com características que lembram o crescimento plagiotrópico.

### **2.2.2. Crescimento em diâmetro e altura**

A redução na capacidade de crescimento em diâmetro e altura com o aumento da maturação pode ser facilmente demonstrada pelo enraizamento de estacas ou pela enxertia de propágulos de diferentes idades. Mudanças provenientes de enxertos e estacas juvenis não somente produzem maior crescimento do caule, como também maior quantidade de folhas e biomassa (GREENWOOD e HUTCHISON, 1993). Uma vez que a capacidade de enraizamento decresce com o aumento da maturação, menores taxas de crescimento em altura e diâmetro das mudas podem ser função de um menor vigor do sistema radicular em propágulos mais maduros (GREENWOOD e HUTCHISON, 1993).

O estágio juvenil possibilita o maior crescimento vegetativo da planta e a produção de grande área foliar, como também a produção de fotoassimilados a serem, posteriormente, utilizados no desenvolvimento dos frutos e do sistema radicular, facilitando a absorção de água e íons do solo (BOLIANI, 1986).

Alguns autores têm sustentado que o reduzido crescimento em diâmetro e altura em árvores mais velhas é devido ao aumento da complexidade e tamanho da árvore, isto é, à idade e não à maturação (HACKETT, 1987a; Zimmermann et al., 1985, citados por GREENWOOD e HUTCHISON, 1993). Mas, segundo GREENWOOD e HUTCHISON (1993), o fato de enxertos de mesmo tamanho inicial, de árvores com diferentes idades, apresentarem taxas de crescimento diferenciadas indica que o decréscimo do potencial de crescimento é também relacionado às características de maturação. A mesma conclusão pode ser extraída de pesquisa realizada por PARKER et al. (1998), que, avaliando mudas originárias de enxertia em plantas de *Pinus elliottii*, após 6 anos no campo, encontraram crescimentos em altura e diâmetro significativamente superiores em mudas resultantes de enxertos com idade de 6 a 9 anos (juvenis), em comparação com aquelas de enxertos com idades acima de 40 anos.

### **2.2.3. Alterações bioquímicas**

De forma geral, pode-se afirmar que estudos científicos relacionando características bioquímicas de plantas juvenis e maduras são escassos. Isso pode ser decorrência da maior dificuldade de realização desses estudos quanto a algumas características, por exemplo relações hormonais internas, devido à necessidade de equipamentos sofisticados e onerosos, muitas vezes inacessíveis aos pesquisadores, a não ser em países ricos.

BAUER et al. (1999), trabalhando com *Persoonia virgata* (arbusto australiano), encontraram maiores níveis de compostos desconhecidos durante o verão em genótipos de maior enraizamento, em comparação com aqueles de menor enraizamento ou em outras épocas do ano. Citaram, ainda, que esses compostos podem ser promotores de enraizamento, com o decréscimo de seus níveis endógenos na primavera, quando o

enraizamento também diminui. Em *Castanea sativa*, VAZQUEZ e GESTO (1982) encontraram maiores teores de substâncias promotoras de enraizamento endógenas (não identificadas) em propágulos juvenis.

GARCIA et al. (2000) avaliaram possíveis diferenças na composição protéica de vários órgãos juvenis e adultos de plantas de oliveira (*Olea europaea*). Concluíram que a composição protéica de órgãos adultos e juvenis de uma mesma planta ou de plantas diferentes foi qualitativamente similar, porém pelo menos um grupo de polipeptídeos de 29 kDa foi mais fortemente expresso em tecidos adultos. Relações similares também foram obtidas em vários cultivares de diferentes origens genéticas.

Além das variações advindas de tecidos juvenis, em comparação com as dos adultos citadas anteriormente, outras têm sido relatadas, como: concentração de proteínas solúveis em tecidos (ALI e WESTWOOD, 1968), concentração de DNA em folhas (Ali e Westwood, citados por HUANG et al., 1990), teor de poliaminas (REY et al., 1994) e teor de clorofila e de antocianina nas folhas (GREENWOOD, 1992; HACKETT e MURRAY, 1993).

#### **2.2.4. Capacidade de enraizamento e vigor radicular**

Uma das mais consistentes expressões da maturação em plantas lenhosas tem sido a transição da alta para a baixa capacidade de enraizamento de estacas caulinares e foliares (HACKETT, 1987a; ELDRIDGE et al., 1994). Para algumas espécies lenhosas, estacas de mudas juvenis, provenientes de sementes, enraízam facilmente, enquanto outras provenientes de plantas mais velhas o fazem esporadicamente, ou definitivamente não enraízam (ZOBEL e TALBERT, 1984).

Estudos em plantas de *Tsugar heterophylla* têm indicado que o potencial de enraizamento de propágulos coletados de diferentes alturas da árvore-matriz traz evidências da existência de um gradiente de maturação, com o grau de maturação aumentando à medida que se aproxima do ápice da planta (GREENWOOD e HUTCHISON, 1993).

Propágulos coletados do ápice e dos ramos laterais de plantas geralmente apresentam potencial de enraizamento menor do que aqueles coletados de regiões mais próximas à base da árvore (HACKETT, 1987a), embora ocorram grandes variações em termos de espécies. Para *Eucalyptus grandis*, por exemplo, trabalhos têm evidenciado que estacas cotiledonares têm alto potencial de enraizamento, enquanto estacas coletadas acima do 15<sup>o</sup> nó apresentam baixo enraizamento ou definitivamente não enraízam (HACKETT, 1987a). Para *Eucalyptus viminalis* e *Eucalyptus pauciflora*, Paton, citado por HACKETT (1987), citou que o alto potencial de enraizamento é perdido completamente após o 4<sup>o</sup> nó. Já em *Eucalyptus camaldulensis*, esse mesmo autor obteve 40-50% de enraizamento em estacas do 100<sup>o</sup> nó e em *Eucalyptus deglupta*, 100% de enraizamento de estacas coletadas acima do 100<sup>o</sup> nó.

Além do aumento dos percentuais de enraizamento em propágulos mais juvenis, a melhor qualidade e a maior rapidez de formação do sistema radicular também têm sido citadas (GOMES, 1987), denotadas pelo aumento no vigor radicular (número e comprimento de raízes) (SCHNECK, 1996).

#### **2.3. Rejuvenescimento de plantas**

Na multiplicação de plantas adultas, tem sido necessário explorar a maior capacidade de propagação de material juvenil, seja pela utilização de propágulos de

partes juvenis da planta, seja pela promoção do rejuvenescimento de partes da planta adulta (ASSIS, 1986; HACKETT, 1987a).

As características relacionadas à maturação não necessariamente são alteradas da mesma forma, facilidade e intensidade quando se promove o rejuvenescimento (HACKETT e MURRAY, 1993). Assim, mudanças em uma característica não necessariamente são requeridas para ocorrerem em outras, o que levaria a crer que todas elas não estariam controladas por um único mecanismo. As características relacionadas ao estado de maturação são estáveis, porém reversíveis, e a possibilidade de se manipular cada uma delas independentemente torna-se muito atrativa em termos práticos para a área florestal (GREENWOOD, 1992; HACKETT e MURRAY, 1993).

Desse modo, não é surpresa que algumas características relacionadas à maturação sejam mais facilmente rejuvenescidas que outras, que a sua facilidade de rejuvenescimento possa modificar com o passar do tempo ou que um tratamento ou intensidade de tratamento particular ou duração possa influenciar uma ou várias características, porém não todas, o que leva a crer que o rejuvenescimento ocorre em termos relativos e não absolutos (HACKETT e MURRAY, 1993).

Entre os métodos de rejuvenescimento de plantas mais utilizados, podem-se citar a micropropagação seriada, a enxertia seriada, a estaquia seriada e as podas drásticas.

### **2.3.1. Rejuvenescimento por micropropagação seriada**

Estudos indicam que as características relacionadas à maturação podem ser modificadas por meio da cultura *in vitro* seriada (GONÇALVES, 1982; HACKETT, 1987b; BONGA e VON ADERKAS, 1992; HACKETT e MURRAY, 1993). Para *Eucalyptus* spp., a literatura tem mostrado que o potencial de enraizamento e vigor dos propágulos de árvores maduras aumenta com os sucessivos subcultivos *in vitro* (CHAPERON, 1987; HACKETT, 1987a; XAVIER e COMÉRIO, 1997). Para *Sequoia sempervirens*, HUANG et al. (1990) concluíram que os subcultivos *in vitro* incrementam o vigor e a habilidade de enraizamento, embora não tenham sido observadas diferenças muito acentuadas.

Segundo FRANCKETT et al. (1987), a técnica da micropropagação é eficiente no rejuvenescimento de propágulos maduros, embora muitas espécies arbóreas maduras não possam ser micropropagadas em escala comercial, provavelmente em razão da falta de otimização das condições de cultura *in vitro* e do número insuficiente de subcultivos adotados. Em experimento conduzido com explantes de *Sequoia sempervirens* coletados de árvores com 50 e 500 anos de idade, esses mesmos autores chegaram à conclusão de que o principal fator de rejuvenescimento pela micropropagação foi o tempo de exposição dos explantes a BAP (benzilaminopurina). Assim, menores períodos entre um subcultivo e outro aumentaram o rejuvenescimento, principalmente, dos propágulos das árvores de 500 anos.

Uma aplicação direta do rejuvenescimento pela micropropagação seriada na área florestal é a microestaquia, a qual é baseada no máximo aproveitamento da juvenildade dos tecidos vegetais, cujos desenvolvimento e aplicação em *Eucalyptus* tiveram como origem os trabalhos realizados por ASSIS et al. (1992).

TITON (2001), avaliando a sobrevivência na saída da casa de vegetação, enraizamento na saída da casa de sombra e sobrevivência das mudas aos 50 dias, observou, em clones de *Eucalyptus*, resultados superiores na microestaquia em relação à miniestaquia. Essa diferença foi mais pronunciada em clones com maior dificuldade de enraizamento, indicando, nesses casos, possível efeito de rejuvenescimento dos clones com o uso da microestaquia. Para o mesmo experimento, as mudas oriundas da

microestaquia apresentaram altura e diâmetro de colo aos 50 dias e peso de matéria seca de raiz aos 28 dias iguais ou superiores aos da miniestaquia, reforçando a suposição de maior grau de juvenildade das microestacas em detrimento das miniestacas.

### **2.3.2. Rejuvenescimento por enxertia seriada**

Neste método, propágulos maduros são enxertados em partes juvenis de um porta-enxerto, promovendo maior habilidade para o enraizamento das estacas provenientes desses brotos (MENZIES, 1992; KAO e HUANG, 1993).

Vários resultados indicam que esse tipo de tratamento causa indução às características juvenis de propágulos maduros (HACKETT, 1987a; HUANG et al., 1990; KIM et al., 1993). O grau de rejuvenescimento obtido depende do número de reenxertias do enxerto no porta-enxerto juvenil, bem como do gênero envolvido (HUANG et al., 1990). Resultados experimentais têm apontado que duas (KIM et al., 1993), quatro (HUANG et al., 1990; KAO e HUANG, 1993; ASSIS, 1996) ou de quatro a seis (ELDRIDGE et al., 1994) reenxertias são suficientes para rejuvenescer o material até o ponto de enraizar facilmente, tendo-se variações em termos de espécies.

Para HUANG et al. (1990), a enxertia seriada é o mais consistente método de rejuvenescimento de plantas ou partes maduras destas e também o mais utilizado. Esses autores confirmaram a efetividade da enxertia seriada *in vitro* no rejuvenescimento de *Sequoia* e *Citrus*.

Segundo ELDRIDGE et al. (1994), a enxertia seriada é um método de rejuvenescimento caro, que demanda muito tempo e, segundo KIM et al. (1993), apresenta problemas de incompatibilidade.

O rejuvenescimento *in vitro* pode ser obtido mais rapidamente em comparação com o *in vivo*, uma vez que menores porções de brotos e porta-enxertos mais jovens são empregados (HUANG et al., 1990). Para a enxertia de *Citrus*, esses mesmos autores citaram a utilização de ápices caulinares com cerca de 0,3 cm de comprimento e mudas com duas semanas de idade como porta-enxerto.

O fato de enxertar propágulos maduros de uma planta em plantas juvenis, promover o rejuvenescimento, evidencia a translocação de substâncias da parte juvenil (porta-enxerto) para a parte adulta (enxerto), induzindo um estágio mais juvenil nesta última. Porém, HACKETT (1987b), após extensiva revisão de trabalhos sobre o assunto, concluiu que o potencial de enraizamento (que atualmente ainda é a maior expressão de maturidade ou juvenildade) de tecidos juvenis e adultos é uma característica das células do sítio de iniciação radicular, não sendo, portanto, relacionado à translocação de promotores ou inibidores.

### **2.3.3. Rejuvenescimento por estaquia seriada**

O efeito da confecção de estacas de brotações das estacas enraizadas sobre o rejuvenescimento em *Eucalyptus* spp., resultando em efeitos positivos sobre o enraizamento, foi citado por ELDRIDGE et al. (1994), embora ainda haja poucos relatos nesse sentido.

Para *Picea abies*, CLAIR et al. (1985), estudando o efeito de cinco gerações de estaquia seriada, não encontraram resultado significativo dessa técnica no crescimento em diâmetro e altura das mudas resultantes, o que pode ser atribuído ao grande intervalo entre os subcultivos (em torno de cinco anos).

Segundo VON ADERKAS e BONGA (2000), a estaquia seriada promove o rejuvenescimento de plantas em razão do estresse induzido pelos cortes de tecidos, além do não-suprimento de hormônios e nutrientes para os propágulos, em virtude da inexistência de raízes na fase inicial de enraizamento.

O rejuvenescimento pela miniestaquia seriada pode vir a ser uma alternativa eficiente para clones de *Eucalyptus*, principalmente em vista de sua fácil implementação e custos envolvidos.

#### **2.3.4. Rejuvenescimento por podas drásticas**

A realização do corte raso de árvores adultas para induzir o crescimento de brotações juvenis e a manutenção da juvenilidade por podas sucessivas visa aumentar a produção de propágulos e manter a juvenilidade destes (HACKETT, 1987a). Esse sistema tem sido usado com sucesso na produção de estacas de *Eucalyptus*, no Brasil (CAMPINHOS JR. e IKEMORI, 1980), sendo a base para a propagação clonal comercial (HACKETT, 1987a).

Garner e Hatcher, citados por HACKETT (1987a), baseados em trabalhos com clones de macieira, consideraram que ocorre um revigoramento fisiológico e não um rejuvenescimento por meio das podas drásticas, uma vez que ramos de um ano de idade em jardim clonal podem florescer mesmo com um alto potencial de enraizamento. Porém, outras características consideradas de plantas adultas, como filotaxia, menor vigor vegetativo e outros, são revertidas, denotando que o material realmente sofreu algum tipo de rejuvenescimento, aliado ao revigoramento.

#### **2.3.5. Outras práticas de rejuvenescimento**

Um método natural de promover o rejuvenescimento de partes maduras de plantas é a propagação sexuada, o qual, segundo HACKETT (1987b), é o mais eficiente em termos de rejuvenescimento.

Além das citadas anteriormente, existem várias outras práticas ou métodos para reverter ou manter a juvenilidade das plantas: tratamento térmico (frio ou calor), tratamento com raios X, neodiferenciação de gemas e apomixia (GONÇALVES, 1982), indução de ramos adventícios em porções de raízes, utilização do crescimento juvenil originado dos esferoblastos (HARTMANN et al., 1997) e baixa luminosidade (HACKETT, 1987b). Esses métodos, porém, têm sido menos estudados e relatados.

### **2.4. Indicadores bioquímicos do potencial rizogênico dos propágulos**

Dentro da área de produção de mudas, têm sido desenvolvidas algumas técnicas destinadas à propagação vegetativa de plantas, porém o seu sucesso depende basicamente do potencial rizogênico dos propágulos (HARTMANN et al., 1997). Em virtude disso, os avanços no conhecimento e identificação dos processos que acompanham e controlam a rizogênese são de vital importância, uma vez que poderiam levar à identificação de compostos que possibilitem a seleção precoce de material apto para enraizar.

Existem inúmeros compostos que podem estar envolvidos na regulação do potencial rizogênico de propágulos, entre os quais se encontram as peroxidases, os compostos fenólicos, os carboidratos e as relações hormonais internas.

### 2.4.1. Peroxidases

Peroxidases são enzimas presentes em todas as plantas verdes, alguns fungos e bactérias aeróbicas (SIEGEL, 1993), em que são requeridas para catalisar o último passo enzimático na biossíntese de lignina, catabolismo de hormônios, defesa e oxidação fenólica (CHRISTENSEN et al., 1998). Estudos citoquímicos têm evidenciado que as peroxidases participam, direta e indiretamente, de diversos eventos fisiológicos, incluindo a dormência, a tolerância ao frio, a germinação, a resistência ao parasitismo (GASPAR et al., 1982) e a biossíntese do etileno (GASPAR et al., 1982; ZANOL, 1996).

Alta atividade de peroxidases tem sido relacionada com o aumento do percentual de formação de raízes, evidenciando a atividade de peroxidase como um marcador da habilidade de formação de raízes (DRUART et al., 1982; OERTLI, 1987). Porém, segundo THOMPSON et al. (1987), a peroxidase apresenta um padrão geral de aumento da atividade com o incremento da senescência dos órgãos e tecidos.

Existem poucos estudos em relação à atividade de peroxidases e à juvenildade ou maturidade de um tecido ou planta, porém, uma vez que plantas juvenis teriam maior adaptação às pressões do ambiente, poderia imaginar-se que essas plantas apresentariam maior atividade de peroxidases. Para *Sequoia sempervirens*, HUANG et al. (1996) obtiveram rejuvenescimento de material adulto após cinco enxertias seriadas, o que estava associado com a diminuição do conteúdo de isoenzimas da peroxidase.

### 2.4.2. Compostos fenólicos

Vários estudos têm sido realizados com a finalidade de buscar possíveis relações entre compostos fenólicos e o potencial rizogênico dos propágulos. Inicialmente, ressaltava-se o efeito inibitório dos fenóis sobre a formação de raízes (KEFELI e KADYROV, 1971), porém HAISSIG (1974) relatou que a formação de primórdios radiculares necessita de conjugados AIA-fenóis, sintetizados com a participação de enzimas, como peroxidases e polifenol oxidases. Segundo DEBERGH e READ (1991), um grupo especial de compostos fenólicos é protetor das auxinas por atuar como antioxidantes, inibindo a oxidação do AIA.

Outros trabalhos têm indicado que, em geral, monofenóis e m-difenóis estimulam a oxidação do AIA, enquanto o-difenóis, p-difenóis e polifenóis inibem essa reação (LEE et al., 1982), bem como a não-relação do teor de fenóis totais sobre o número de raízes em plantas de *Castanea sativa* (bom enraizamento) e *Salix viminalis* (baixo enraizamento), encontrado por GESTO et al. (1977), e sobre a correlação positiva entre o enraizamento e o teor de fenóis orto-dihidróxi e totais em espécies do gênero *Prunus* (RANA e CHADHA, 1989).

A utilização do teor de fenóis totais no monitoramento da rizogênese está relacionada com a participação do AIA e de outros compostos importantes para o enraizamento, como o teor de lignina (DRUART et al., 1982; SIEGEL, 1993). Além disso, segundo esses mesmos autores, o teor de fenóis totais possui relação inversa com a peroxidase.

Tem sido observado também que fenóis do tipo flavonóide poderiam participar na regulação do transporte polar das auxinas (Jacobs e Rubery, citados por TAIZ e ZEIGER, 1991), o que poderia levar à acumulação de AIA na base dos propágulos. Para macieira, ZANOL et al. (1998) obtiveram maior percentual de enraizamento e uma

aceleração na emergência de raízes com a adição do composto fenólico floroglucinol ao meio de cultura *in vitro*, além do impedimento da formação de calo.

Existem poucos estudos em relação ao teor de fenóis e à juvenilidade ou maturidade de um tecido ou planta. VIERLING et al. (1992), trabalhando com *Prunus domestica*, encontraram maior teor de fenóis em folhas juvenis quando comparadas com folhas adultas, sendo o mesmo comportamento verificado em gemas de *Castanea sativa* x *Castanea crenata* (MATO et al., 1994).

### 2.4.3. Carboidratos e nitrogênio total

O teor de carboidratos dos propágulos vegetativos tem sido considerado como um fator importante no sucesso do enraizamento por muitos pesquisadores, embora ainda haja controvérsias acerca dessa constatação.

A iniciação radicular requer energia, portanto altos níveis de carboidratos nas estacas têm sido relacionados como importantes para obtenção de sucesso e maior velocidade no enraizamento (GOMES, 1987; CHALFUN, 1989; HARTMANN et al., 1997).

Para OKORO e GRACE (1976), o teor de carboidratos não explicou a maior capacidade de enraizamento de estacas de *Populus euramericana* (com alta capacidade de enraizamento) em relação a estacas de *Populus tremula* (com baixa capacidade de enraizamento) e sim a existência de raízes pré-formadas naquela e não nesta, além de um transporte mais efetivo dos carboidratos para a região basal da estaca, onde ocorre o enraizamento. O mesmo comportamento foi observado por WELANDER (1995) em propágulos de *Betula pubescens*.

Para MODAK et al. (1990), a imersão das estacas e, ou, o pincelamento destas com solução de sacarose 0,1 e 1% resultaram em maiores índices de enraizamento em *Adhatoda vasica*, e, segundo RANA e CHADHA (1989), o percentual de enraizamento de plantas do gênero *Prunus* foi positivamente correlacionado com o teor total de carboidratos

Existem evidências de que estacas provenientes de plantas bem nutridas, porém com teores de nitrogênio (N) menores do que de plantas bem supridas deste nutriente, enraízam com maior facilidade (FACHINELLO, 1986; MENZIES, 1992). Segundo HARTMANN et al. (1997), geralmente o enraizamento é negativamente correlacionado com o teor de N, o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos por RANA e CHADHA (1989). Nessa situação, o maior índice de enraizamento foi atribuído ao maior acúmulo de carboidratos ou à redução dos níveis de citocininas na estaca (FACHINELLO, 1986). Alta relação C/N é um índice que tem se correlacionado positivamente com o percentual de enraizamento.

Em estudos de nutrição realizados em *Juniperus virginiana*, as concentrações internas de amido e sacarose dos propágulos na época de sua excisão foram significativamente correlacionadas com o percentual de enraizamento e comprimento das raízes (HENRY et al., 1992). Nesses mesmos estudos, embora a fertilização das plantas doadoras de propágulos com N afetasse o enraizamento, não foi encontrada correlação significativa entre os níveis internos de N nas folhas e o enraizamento.

A maioria dos estudos relacionando carboidratos e N com o potencial de enraizamento foi realizada em condições *in vitro*. Com relação à técnica de miniestaquia, ainda não se têm estudos nesta linha do conhecimento.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em quatro partes, nas quais se estudaram, seqüencialmente: 1) a influência dos subcultivos de miniestaquia seriada no rejuvenescimento em relação à capacidade de produção, vigor e sobrevivência das minicepas, bem como sobre sobrevivência, enraizamento e vigor das miniestacas; 2) a eficiência do rejuvenescimento pela miniestaquia seriada em relação à micropropagação; 3) o efeito da aplicação de diferentes dosagens do regulador de crescimento AIB (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>) no enraizamento de miniestacas oriundas de diferentes subcultivos de miniestaquia seriada; e 4) a existência de indicadores bioquímicos (atividade total de peroxidase e teor de fenóis totais) do potencial rizogênico de miniestacas rejuvenescidas pela miniestaquia seriada.

#### 3.1. Material experimental

O experimento foi conduzido na Empresa Celulose Nipo-brasileira S.A. - CENIBRA, sediada no Município de Belo Oriente, MG. Foram utilizados quatro clones de *Eucalyptus grandis* (CC10, CC12, CC14 e CC15), selecionados em uma população de procedência de Rio Claro, SP.

Os clones se encontravam em jardim clonal comercial, de onde foram resgatados pela técnica de estaquia convencional, com manejo e nutrição de acordo com os procedimentos adotados pela empresa CENIBRA.

O Município de Belo Oriente, MG, localiza-se na região do Vale do Rio Doce, com clima do tipo Cwa (subtropical, chuvoso e mesotérmico), segundo a classificação de Köppen, latitude de 19°18'23" S e longitude de 42°22'46" W e uma altitude média de 363 m. Apresenta precipitação média anual de 1.233 mm, temperatura média anual de 21 °C, com máxima de 27 °C e mínima de 14 °C (INSTITUTO...- IBGE, 1969).

#### 3.2. Metodologia de rejuvenescimento

##### 3.2.1. Rejuvenescimento por miniestaquia seriada

A partir de clones estabelecidos em jardim clonal de campo, foram obtidas as brotações destinadas à confecção das estacas para o processo de propagação vegetativa por estaquia. Em torno de 90 dias após o enraizamento, as mudas foram submetidas à decepa da parte aérea a 6 - 8 cm acima da brotação da estaca enraizada, para que fossem formadas as minicepas e, conseqüentemente, o jardim miniclinal, denominado subcultivo zero.

Do jardim miniclinal assim formado, foram obtidas as miniestacas, as quais foram enraizadas em casa de vegetação sem a aplicação de regulador de crescimento, conforme metodologia adotada pela Empresa CENIBRA. As miniestacas permaneceram em casa de vegetação por 25 dias, seguindo, posteriormente, para aclimação em casa de sombra, onde permaneceram por mais 10 dias, e, posteriormente, para rustificação em pleno sol, quando, após 20 dias, foram podadas para formação das minicepas do subcultivo 1.

As mudas formadas a partir das miniestacas enraizadas do subcultivo 1, ao atingirem 10 a 12 cm de tamanho (em torno dos 60 dias de idade), tiveram a parte apical podada a uma altura de 6-8 cm da base, constituindo, assim, as minicepas do subcultivo 2, que, após 20 - 30 dias, forneceram as brotações (miniestacas). As minicepas do subcultivo 2, de forma similar àsquelas do subcultivo 1, forneceram novas miniestacas para formação do jardim miniclinal do subcultivo 3, e assim sucessivamente até o subcultivo 7. Dessa forma, foram formados sete jardins miniclinais (JM0, JM1, JM2, JM3, JM4, JM5 e JM6), ou seja, sete subcultivos de rejuvenescimento (subcultivos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

A fertilização mineral utilizada no substrato foi composta por superfosfato simples em aplicação direta ( $8 \text{ kg m}^{-3}$ ) e pela solução de sulfato de amônio (18 kg/900 L), cloreto de potássio (3 kg/900 L), sulfato de zinco (0,2 kg/900 L), sulfato de cobre (0,2 kg/900 L), sulfato de manganês (0,2 kg/900 L) e ácido bórico (0,35 kg/900 L), sendo aplicados 5 L dessa solução para cada 100 L de substrato.

O jardim miniclinal foi localizado em ambiente coberto por plástico transparente e conduzido em sistema de hidroponia em calhetão, com aproximadamente 100 minicepas por metro quadrado, sendo cada clone representado por 130 minicepas por subcultivo.

Em intervalos regulares de 5 a 10 dias, as minicepas receberam podas seletivas para coleta de miniestacas, sendo mantidas durante toda a fase experimental, visando a um manejo adequado de produção de miniestacas nos jardins miniclinais.

### **3.2.2. Rejuvenescimento por micropropagação seriada**

O jardim microclonal constituiu de mudas micropropagadas oriundas de material rejuvenescido no Laboratório de Cultura de Tecidos II, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Adotou-se a micropropagação pela proliferação de gemas axilares, em que, na fase de cultivo *in vitro*, os clones passaram por 10 subcultivos em multiplicação, em intervalos de 20 a 30 dias, visando ao rejuvenescimento. O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e vitaminas de White (WHITE, 1943), acrescidos de mioinositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), PVP (polivinilpirrolidona) ( $800 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarose (3%), ágar Sigma (0,7%) e ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina), conforme a fase da cultura.

Após a fase de multiplicação e alongamento *in vitro*, as gemas alongadas foram enraizadas em casa de vegetação (*ex vitro*), sem a aplicação de reguladores de crescimento na base das microestacas. Nessa fase, as microestacas foram colocadas para enraizamento em tubetes plásticos de 55 cm<sup>3</sup>, contendo substrato formado pela mistura em partes iguais de vermiculita de granulometria média e casca de arroz carbonizada.

O enraizamento das microestacas e a nutrição, formação e constituição do jardim microclonal seguiram os mesmos procedimentos adotados na miniestaquia, conforme descrito no item 3.2.1.

### **3.2.3. Instalação dos experimentos**

Uma vez formados os jardins dos sete subcultivos de miniestaquia seriada foram coletadas, ao mesmo tempo, miniestacas dos jardins de subcultivos zero (jardim formado de mudas originárias de estacas), 2, 4 e 6, após a sua formação ter sido completada. Nesses jardins foram enraizadas miniestacas e formadas as minicepas para os jardins utilizados na experimentação (jardim miniclinal de subcultivos 1, 3, 5 e 7), os quais forneceram as miniestacas para os testes comparativos.

Este procedimento, além de facilitar a operacionalização dos testes comparativos entre os subcultivos, objetivo do presente estudo, visou também à padronização da idade das minicepas de todos os subcultivos.

### **3.2.4. Manejo nutricional e hídrico dos jardins clonais**

O sistema de manejo adotado dos jardins clonais (mini e micro) foi o de hidroponia em calhetão de areia (Figura 1). A nutrição mineral adotada foi aplicada via solução nutritiva, sendo composta das seguintes soluções-estoque: solução 1: nitrato de cálcio - 25 kg/900 L de água; solução 2: sulfato de amônio - 9 kg/900 L de água, ácido fosfórico - 3 L /900 L de água, cloreto de potássio - 10 kg/900 L de água e sulfato de magnésio - 13 kg/900 L de água; solução 3: ácido bórico - 600 g/900 L de água, sulfato de zinco - 50 g/900 L de água, sulfato de cobre - 60 g/900 L de água e sulfato de manganês - 340 g/900 L de água; e solução 4: sulfato ferroso - 230 g/900 L de água e EDTA dissódico - 350 g/900 L de água.



Figura 1 – Jardim clonal em hidroponia, sistema de calhetão, em ambiente coberto com plástico transparente.

Para cada 900 litros de solução a ser aplicada, utilizaram-se: 90 mL da solução 4, 90 mL da solução 3, 90 mL de HCl 2,5 N, 18 L da solução 2 e 18 L da solução 1; desta solução, aplicaram-se em torno de  $5 \text{ L m}^{-2}$  de calhetão, uma vez ao dia. Semanalmente, foi realizada uma irrigação com água pura (em torno de  $15 \text{ L m}^{-2}$ ) para lavagem do excesso de sais, e após a lavagem foram aplicados  $2 \text{ L m}^{-2}$  de solução de cal, formada por 5 kg de cal hidratada para cada 900 L de água.

A irrigação foi efetuada uma vez ao dia, de forma manual, com o auxílio de mangueiras com o final em forma de chuveiro.

### 3.3. Condução e avaliações experimentais

As avaliações foram divididas em quatro partes, de acordo com os objetivos definidos para o presente estudo, conforme descrito nos tópicos subseqüentes.

#### 3.3.1. Enraizamento das mini e microestacas

Para o enraizamento e formação das mudas, as mini e microestacas foram enraizadas em tubetes plásticos de  $55 \text{ cm}^3$ , contendo substrato formado pela mistura, em partes iguais, de vermiculita de granulometria média e casca de arroz carbonizada.

A nutrição mineral utilizada no substrato foi composta por superfosfato simples em aplicação direta ( $8 \text{ kg m}^{-3}$ ) e pela solução de sulfato de amônio ( $18 \text{ kg/900 L}$ ), cloreto de potássio ( $3 \text{ kg/900 L}$ ), sulfato de zinco ( $0,2 \text{ kg/900 L}$ ), sulfato de cobre ( $0,2 \text{ kg/900 L}$ ), sulfato de manganês ( $0,2 \text{ kg/900 L}$ ) e ácido bórico ( $0,35 \text{ kg/900 L}$ ), sendo aplicados 5 L desta solução para cada 100 L de substrato.

As miniestacas permaneceram em torno de 25 dias na casa de vegetação, seguindo-se, posteriormente, para a casa de sombra, onde permaneceram por mais 10 dias, para aclimatação e, finalmente, para rustificação em pleno sol, quando, aos 50 dias de idade, foi realizada a avaliação final.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 4 (quatro subcultivos e quatro clones) e cinco repetições, com parcela de 24 plantas. Para miniestaquia x micropropagação seriada, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2 (três subcultivos: subcultivos 1 e 7 de miniestaquia e o subcultivo *in vitro*; e dois clones) e cinco repetições, com parcelas de 24 plantas.

### **3.3.2. Avaliações: miniestaquia seriada**

- a) Produção de miniestacas por minicepa e por coleta, em função do clone e do subcultivo envolvido.
- b) Sobrevivência das minicepas nas sucessivas coletas em função do clone e do subcultivo envolvido.
- c) Vigor vegetativo das minicepas pela realização de poda drástica de todas as brotações acima de 0,5 cm de comprimento, sendo, posteriormente, feito um acompanhamento da velocidade de emissão de brotações, por intermédio de medições efetuadas aos 3, 6, 9 e 12 dias, adotando-se três classes de comprimento de miniestacas (classe 1: 0,5 a 2,0 cm; classe 2: 2,1 a 4,0 cm; e classe 3: > 4,0 cm). Ao término dos 12 dias, foi avaliado o peso de matéria seca das brotações.
- d) Velocidade de enraizamento das miniestacas: número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento total de raízes (somatório do comprimento de todas as raízes da miniestaca enraizada) e biomassa radicular aos 15, 20 e 25 dias.
- e) Crescimento em altura, diâmetro de colo e peso da matéria seca das partes aérea e radicular das mudas aos 50 dias.
- f) Sobrevivência na saída das casas de vegetação e de sombra e aos 50 dias.

Os dados foram submetidos a análises de variância, tendo as médias de produtividade do jardim miniclonal nas diferentes coletas (item a) sido discriminadas pelo teste de Agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade e o restante das avaliações (itens c, d, e, f), comparado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.3.3. Avaliações: miniestaquia seriada x micropropagação**

Adotaram-se os mesmos procedimentos das avaliações realizadas para a miniestaquia em relação ao vigor vegetativo das mini e microcepas (item 3.3.2. - c), velocidade de enraizamento das mini e microestacas (item 3.3.2. - d), crescimento em altura, diâmetro de colo e peso da matéria seca das partes aérea e radicular (item 3.2.2. - e) e da sobrevivência na saída das casas de vegetação e de sombra e aos 50 dias (item 3.2.2. - f).

Os dados resultantes foram submetidos a análises de variância, tendo as médias sido comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.3.4. Avaliações: efeito hormonal**

Buscando avaliar o efeito da aplicação do regulador de crescimento AIB no enraizamento das miniestacas, foram testadas quatro concentrações (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>), via líquida, dissolvidas em hidróxido de sódio (NaOH) e completado com água destilada. As miniestacas tiveram suas bases mergulhadas na solução de regulador por um período de 10 segundos antes de serem estaqueadas no substrato.

Para essa etapa foram utilizadas as seguintes avaliações:

- a) Crescimento em altura, diâmetro de colo e peso da matéria seca das partes aérea e radicular aos 50 dias.
- b) Sobrevivência na saída das casas de vegetação e de sombra e aos 50 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 4 x 4 (quatro subcultivos, quatro dosagens do regulador de crescimento AIB e quatro clones), com cinco repetições e parcelas de 16 plantas.

## **3.4. Análises bioquímicas**

Para realização das análises bioquímicas, coletaram-se brotações do jardim miniclinal (com sete dias de idade) de todos os clones e subcultivos, as quais foram transformadas em miniestacas, com tamanho entre 3 e 5 cm, contendo de um a três pares de folhas reduzidas à metade. Ao mesmo tempo em que foi realizada a coleta das brotações para análise, foram enraizadas miniestacas para determinação das características de sobrevivência, enraizamento e vigor.

As brotações coletadas foram acondicionadas em embalagens plásticas, identificadas e imediatamente colocadas em caixas de isopor com gelo no fundo, coberto com serragem. Em seguida, foram transportadas para o Laboratório de Análise de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa e armazenadas a -10 °C até a realização das extrações. Foram coletados em torno de 5 g de brotações entre 3 e 6 cm de comprimento dentro de cada clone, subcultivo e repetição.

### **3.4.1. Atividade da enzima peroxidase**

A atividade da enzima peroxidase foi determinada de acordo com a técnica descrita por JAEGHER et al. (1985) e adaptada para o experimento em questão. O extrato foi preparado (sempre com temperatura abaixo de 4 °C), utilizando-se 500 mg

de matéria fresca. Este foi triturado em liquidificador por 3 min, em presença de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (1,5 mL) a pH 5,8. Em seguida, esse extrato foi centrifugado a 18.000 rpm, a  $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 10 min, retirando e colocando-se o sobrenadante em Eppendorf mantido no gelo.

Para a amostra, a cada 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 615  $\mu\text{L}$  de guaiacol em tampão  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; para o branco, a cada 150  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foram adicionados 3,5 mL de guaiacol em tampão  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Perkin Elmer) em comprimento de onda de 436 nm e intervalo de 8 min, conforme o ajuste da curva.

### 3.4.2. Teor de fenóis totais

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com a técnica descrita por SWAIN e HILLIS (1959) e adaptada para o experimento em questão. Pesaram-se 500 mg de matéria seca e moída, onde foram adicionados 5 mL de etanol (80%), sendo a mistura levada ao condensador por uma hora e meia (após começar a borbulhar). Em seguida, foi feita a filtração, levando-se o filtrado para o rotoevaporador (evaporado 80% do volume inicial), o qual foi transferido para frasco de armazenamento, injetando-lhe  $\text{N}_2$ , para conservação.

Para a curva-padrão de compostos fenólicos, utilizou-se solução de fenol 10 mg/100 mL, reagente de Folin-Dennis e solução saturada de carbonato de sódio. Em tubos de 10 mL, colocou-se o equivalente a 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1.000  $\mu\text{L}$  de solução fenol, completou-se o volume para 3,5 mL com água destilada, adicionou-se 0,25 mL do reagente de Folin-Dennis e agitaram-se os tubos. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL da solução de carbonato de sódio, procedendo-se à agitação de todos os tubos novamente; após elevar a mistura para 5 mL, mediante a adição de 0,75 mL de água destilada, efetuou-se nova agitação. Em torno de uma hora após, foi lida a absorvância em espectrofotômetro (Perkin Elmer) a 730 nm e confeccionado um gráfico, colocando na abscissa o  $\mu\text{L}$  de solução fenol e, na ordenada, a absorvância, resultando na equação ajustada  $Y = 0,0021 X + 0,096$ , em que Y é a absorvância e X, a solução de fenol.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

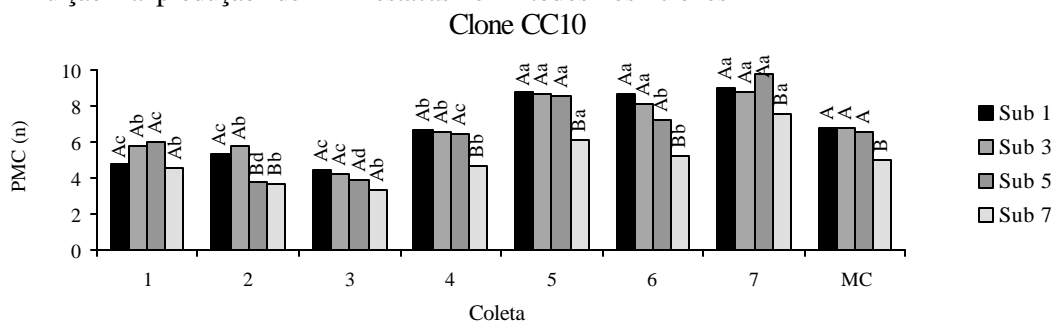
Com base nos objetivos definidos para o presente trabalho, os resultados são apresentados em relação: 1) aos efeitos do rejuvenescimento pela miniestaquia seriada; 2) à eficiência da miniestaquia seriada no tocante à micropropagação; 3) aos efeitos da aplicação do regulador de crescimento AIB no enraizamento; e 4) à avaliação da existência de indicadores bioquímicos (atividade total de peroxidase e teor de fenóis totais), quanto ao potencial rizogênico das miniestacas de *Eucalyptus grandis*.

### 4.1. Rejuvenescimento: miniestaquia seriada

#### 4.1.1. Sobrevivência e produção das minicepas

A sobrevivência das minicepas dos jardins miniclonaes foi superior a 96% após as sete coletas de miniestacas para todos os clones e subcultivos, indicando que o sistema de jardim em calhetão utilizado foi eficiente, aliado ao bom manejo adotado.

Com base na Figura 2, depreende-se que as minicepas dos tratamentos com maior número de subcultivos, principalmente do subcultivo 7, tiveram tendência de diminuição na produção de miniestacas em todos os clones





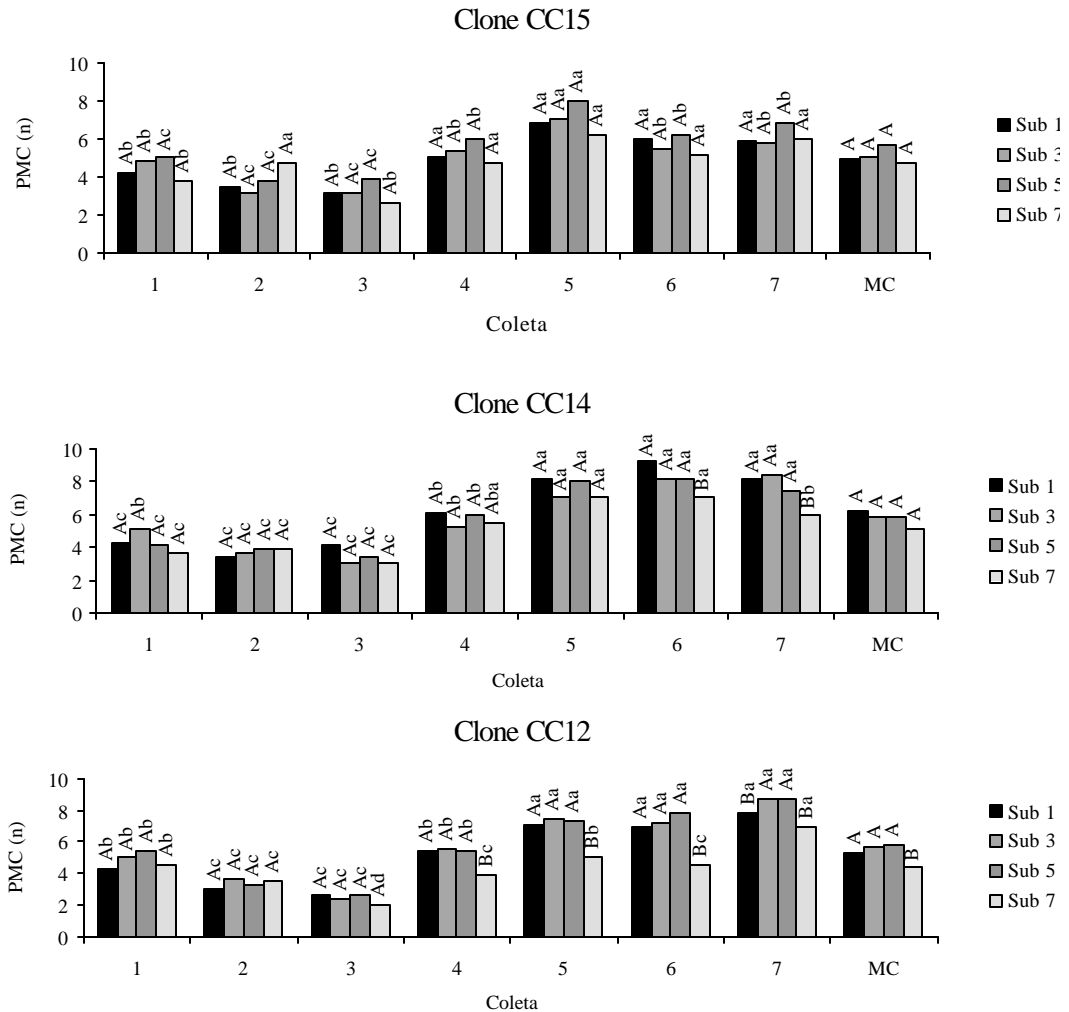


Figura 2 – Produção de miniestacas por minicepa por coleta (PMC) dos quatro subcultivos de miniestaquia seriada (Sub) em função do número de coletas efetuadas no jardim miniclonal, dos quatro clones de *Eucalyptus grandis* e média das sete coletas (MC). As médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de uma mesma coleta e as seguidas de uma mesma letra minúscula entre as coletas dentro de cada subcultivo, respectivamente, não diferem entre si, pelo teste de Agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

estudados, exceto o CC15, embora tenha havido comportamentos diferenciados em relação às coletas. Isso pode ser em razão do maior grau de juvenildade dos tratamentos com maior número de subcultivos, resultando em miniestacas maiores e mais vigorosas, com tendência ao crescimento mais ortotrópico, com maior crescimento vegetativo em altura e menor número de brotos laterais. Tais resultados corroboram os encontrados por TITON (2001) em *Eucalyptus*, em que foi citada a persistência da dominância apical em mudas com maior grau de juvenildade.

Quanto às sete coletas de miniestacas, percebeu-se comportamento variável, sendo as de número 5, 6 e 7 de maior produção de miniestacas e as de número 1, 2 e 3 de menor produção, em todos os clones, porém sem a

apresentação de uma tendência clara desse comportamento, à semelhança dos resultados encontrados por TITON (2001). Tal comportamento pode ser devido à necessidade de adaptação das minicepas ao ambiente de hidroponia, bem como à quebra de dominância apical após a poda. Assim, após algumas coletas, as gemas dormentes tornaram-se ativas, resultando em maior estímulo ao crescimento. Um melhor ajuste no manejo do jardim com o decorrer das coletas também pode ter influenciado esse comportamento.

A temperatura e a umidade relativa do ar, bem como a radiação total (irradiância) que as plantas-matrizes recebem durante o seu crescimento, influenciam a produção de propágulos e o posterior enraizamento (MOE, 1987). No experimento, porém, não se observou nenhuma relação entre essas características e a produtividade das minicepas do jardim miniclonal (Quadros 1A, 2A e 3A - Apêndice).

Em relação aos quatro clones estudados, detectou-se pequena superioridade do clone CC10 (com média de 6,3 e variação de 3,3 a 9,7 miniestacas por minicepa), seguido pelo clone CC14 (com média de 5,7 e variação de 3,0 a 9,2 miniestacas por minicepa), pelo clone CC12 (com média de 5,3 e variação de 2,0 a 8,7 miniestacas por minicepa) e pelo clone CC15 (com média de 5,1 e variação de 3,1 a 8,0 miniestacas por minicepa).

Comparando essas médias obtidas em sistema de hidroponia em calhetão (média geral de 5,6 miniestacas por minicepa por coleta) com as médias obtidas por WENDLING (1999) no sistema convencional de tubete (1,9 miniestaca por minicepa) e as médias obtidas por TITON (2001) no sistema de tubetes com fertirrigação por inundação (2,4 miniestacas por minicepa), percebeu-se um grande aumento de produtividade do sistema adotado no presente estudo. Tal comportamento pode ser explicado, principalmente, pelo aumento da área e do volume radicular para absorção dos nutrientes fornecidos às plantas-matrizes.

Analisando a média dos quatro clones (Figura 3), verificou-se maior produtividade das coletas de número 5, 6 e 7 em relação à das coletas 1, 2 e 3, bem como queda no subcultivo 7 nas coletas 5, 6 e 7. Já na média de todas as coletas e clones, não se observou diferença estatística significativa entre os subcultivos.

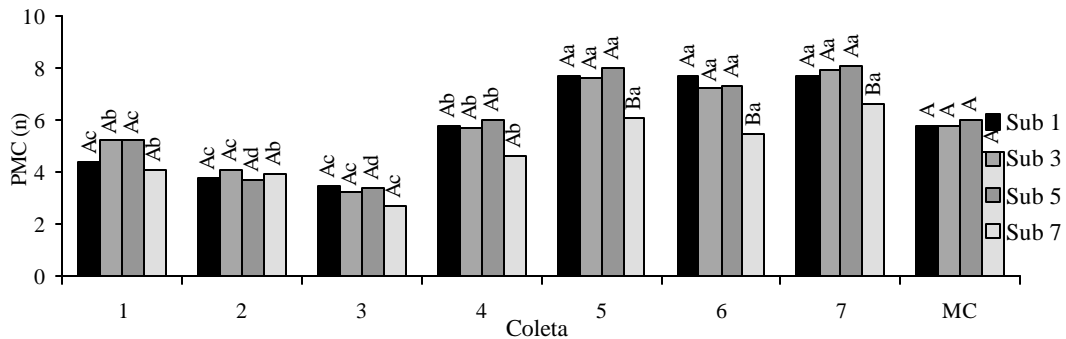


Figura 3 – Produção média de miniestacas por minicepa (PMC) dos quatro subcultivos de miniestaquia seriada (Sub), em função do número de coletas efetuadas no jardim miniclonal, dos quatro clones de *Eucalyptus grandis* e média das sete coletas (MC). As médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de uma mesma coleta e as seguidas de uma mesma letra minúscula entre as coletas dentro de cada subcultivo, respectivamente, não diferem entre si, pelo teste de Agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Essa diversidade de respostas em relação aos clones e às diferentes coletas está de acordo com os resultados obtidos por XAVIER e COMÉRIO (1996) com a técnica de microestaquia e, com base em WENDLING (1999) e TITON (2001), com a técnica de miniestaquia.

#### 4.1.2. Vigor das minicepas

Baseado nos preceitos teóricos sobre juvenilidade e maturação, em que é definido que plantas mais juvenis tendem a apresentar maior vigor de crescimento e maior tendência ao crescimento ortotrópico (GREENWOOD e HUTCHISON, 1993; HARTMANN et al., 1997), aliada à menor produção de brotos apresentada pelo subcultivo 7 (item 4.1.1.), seria esperado que os tratamentos com maior número de subcultivos apresentariam maior vigor das brotações, ou seja, aumento no número de brotações nas classes de tamanho mais altas. Porém, com base no Quadro 1, observou-se que, na maioria das vezes, os subcultivos 1, 3 e 5 foram significativamente superiores nessa característica em relação ao subcultivo 7, principalmente nas classes de tamanho 1 e 2. Já na classe de maior tamanho (classe 3), a tendência de superioridade dos subcultivos 1, 3 e 5 já não se verificou mais com tanta discrepância. Tais constatações podem indicar um possível efeito de rejuvenescimento, uma vez que, em termos gerais, principalmente no subcultivo de número 7, o vigor se igualou mais em relação ao das classes de menor tamanho (classes 1 e 2).

O fato de o vigor das minicepas do subcultivo 7 não se mostrar superior ao das dos subcultivos 1 e 3 pode estar relacionado a um menor vigor inicial destas em relação ao daquelas. Além disso, segundo GREENWOOD (1992) e HACKETT e MURRAY (1993), não é surpresa que algumas características relacionadas à maturação sejam mais facilmente rejuvenescidas que outras e que a facilidade de rejuvenescimento de determinada característica possa modificar-se com a intensidade de tratamento particular ou duração, podendo influenciar uma ou várias características, porém não todas, o que leva à proposição de que o rejuvenescimento ocorre em termos relativos e não absolutos (HACKETT e MURRAY, 1993). Assim, pode-se atribuir o fato de as minicepas do subcultivo 7

Quadro 1 – Número de brotações emitidas pelas minicepas dos quatro subcultivos de miniestaqueia seriada (Sub), distribuídas em três classes de tamanho (1, 2 e 3), avaliadas aos 3, 6, 9 e 12 dias, dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*. As médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de um mesmo clone e idade (diferentes subcultivos) e as seguidas de uma mesma letra minúscula entre os clones na mesma idade, respectivamente, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Clone	Idade (dias)	Classes de Tamanho											
		1 (0,5 – 2,0 cm)				2 (2,1 – 4,0 cm)				3 (> 4,0 cm)			
		Sub 1	Sub 3	Sub 5	Sub 7	Sub 1	Sub 3	Sub 5	Sub 7	Sub 1	Sub 3	Sub 5	Sub 7
CC 10	3	10,9 Aa	11,3 Aab	11,7 Aa	11,4 Aa	2,8 Aa	2,3 Aa	2,2 Aab	1,7 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa
	6	12,1 Aa	9,9 Bab	9,3 Bb	9,2 Ba	7,0 Aa	8,8 Aa	8,8 Aa	8,2 Aa	2,3 Aa	1,5 Aa	0,5 Ba	0,4 Ba
	9	10,0 Aa	8,5 ABa	8,1 ABab	7,6 Ba	9,0 Aab	10,1 Aa	9,8 Aa	9,2 Aa	3,7 Aa	2,2 Bab	0,8 Cb	0,6 Cb
	12	6,2 Aa	7,8 Aab	6,2 Ab	5,0 Aa	6,4 Aa	6,1 Aa	6,5 Ab	6,7 Aa	7,9 Aa	7,9 Aa	8,5 Aa	5,0 Aa
CC 15	3	11,0 Aa	10,9 Aab	10,1 Aa	7,3 Bb	2,5 Aa	1,9 Aa	2,4 Aab	2,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa
	6	9,2 Ac	8,7 Ab	9,4 Ab	6,0 Bb	7,6 Aa	7,7 Aa	7,7 Aa	5,2 Bb	1,1 Ab	1,1 Aab	0,8 Aa	0,6 Aa
	9	8,2 Ab	7,7 Aab	7,8 Ab	5,3 Bb	8,6 Ab	9,2 Aab	8,6 Aab	6,2 Bc	1,5 Ab	2,1 Aab	2,3 Aa	1,3 Aa
	12	8,4 Aa	7,1 ABab	8,4 Aa	5,6 Ba	8,0 Aa	6,5 ABa	6,8 ABab	5,0 Ba	4,1 Ab	3,7 Ac	3,1 Ab	1,6 Ab
CC 14	3	10,5 Aa	10,2 Ab	10,8 Aa	9,1 Ab	1,0 Ab	1,8 Aa	1,3 Ab	0,9 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa
	6	11,4 Aab	11,5 Aa	12,2 Aa	8,7 Ba	4,8 Ab	4,4 Ab	5,1 Ab	5,2 Ab	0,1 Ac	0,6 Ab	0,3 Aa	0,2 Aa
	9	7,9 ABb	6,4 Bb	7,1 ABb	8,5 Aa	7,2 Ab	8,0 Ab	6,8 Ab	7,2 Abc	1,7 Ab	2,4 Aa	2,5 Aa	1,9 Aa
	12	8,2 Aa	8,7 Aa	8,2 Aab	6,8 Aa	6,6 ABa	6,5 ABa	7,8 Aab	5,7 Ba	3,0 Bb	3,8 ABc	4,1 Ab	4,7 Ab
CC 12	3	11,8 Aa	13,0 Aa	11,7 Aa	8,5 Bb	2,7 Aa	2,9 Aa	2,9 Aa	1,5 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa
	6	9,9 ABbc	9,8 ABab	10,3 Aab	8,0 Ba	8,7 Aa	8,4 Aa	7,7 ABa	6,8 Bab	0,6 Abc	0,6 Ab	1,0 Aa	0,4 Aa
	9	8,1 ABb	8,5 ABa	9,5 Aa	7,1 Ba	10,6 Aa	10,5 ABa	9,0 BCa	8,4 Cab	1,0 Ab	1,0 Ab	1,7 Aab	2,0 Aa
	12	7,4 ABa	6,4 ABb	8,4 Aa	5,4 Ba	7,0 ABa	7,8 ABa	8,4 Aa	6,9 Ba	6,4 Aa	5,9 Ab	3,8 Bb	4,6 Ab
Média	3	11,0 A	11,3 A	11,1 A	9,1 B	2,2 A	2,2 A	2,2 A	1,5 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
	6	10,6 A	9,9 A	10,3 A	8,0 B	7,0 A	7,3 A	7,3 A	6,3 A	1,0 A	0,9 A	0,6 A	0,6 A
	9	8,5 A	7,8 AB	8,1 AB	7,1 B	8,9 AB	9,4 A	8,6 AB	7,8 B	2,0 A	1,9 A	1,8 A	1,8 A
	12	7,6 A	7,5 A	7,8 A	5,7 B	7,0 A	6,7 AB	7,4 A	5,9 B	5,4 A	5,3 A	4,9 A	4,9 A

não terem maior vigor a um possível não-rejuvenescimento nessas condições, característica particular de vigor ou que esta não é influenciada ou é pouco influenciada pelo gradiente de juvenilidade dos propágulos.

Analisando o volume de brotações acima de 0,5 cm (total), atestou-se a hipótese de maior brotação de minicepas dos subcultivos 1, 3 e 5, concordando com os resultados de produção de miniestacas (item 4.1.1.). Esse mesmo comportamento pôde ser

visualizado quando se compararam as médias dos diferentes subcultivos, sendo aquelas do subcultivo 7 significativamente inferiores às dos demais subcultivos.

Na Figura 4 é apresentado o peso da matéria seca (PMS) referente à coleta de todas as brotações acima de 0,5 cm de comprimento, realizada aos 12 dias após a poda drástica. Percebe-se, nessa figura, que houve diferença significativa entre os subcultivos estudados somente no clone CC10, em que o subcultivo 7 foi o que produziu menor quantidade de matéria seca, porém não variando significativamente dos subcultivos 1 e 5.

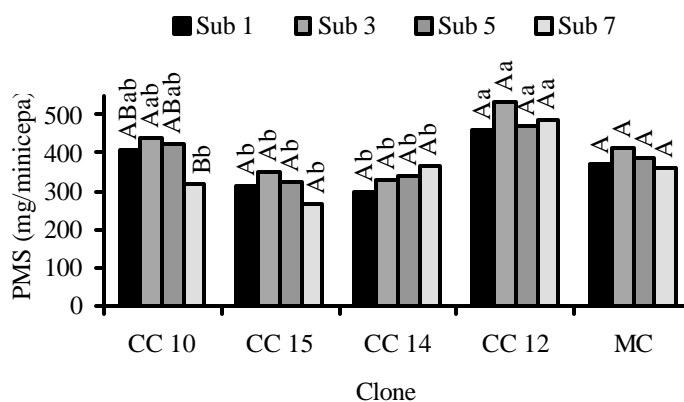


Figura 4 – Médias de peso de matéria seca (PMS) das brotações produzidas pelas minicepas coletadas no final de 12 dias dos quatro subcultivos (Sub) e quatro clones e média dos clones (MC). Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos e de uma mesma letra minúscula entre os clones dentro de cada subcultivo não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação aos quatro clones estudados, observou-se superioridade do clone CC12 (com média de 487,1 mg) e do clone CC10 (com média de 397,2 mg) em relação ao clone CC14 (com média de 332,2 mg) e ao clone CC15 (com média de 312,4 mg). Porém, essa diferença somente foi significativa em termos de superioridade dos clones CC12 e CC10, com exceção do subcultivo 7, em relação aos clones CC14 e CC15.

De modo geral, pode-se concluir que os subcultivos de miniestaque seriada não resultaram em aumento de vigor das minicepas, indicando certa tendência de redução deste com o aumento dos subcultivos. Isso pode estar relacionado à maior tendência ao crescimento ortotrópico, conforme citado por PARKER et al. (1998), resultando em menor número e peso de matéria seca de brotos.

Segundo HACKETT e MURRAY (1993), as características relacionadas à maturação são reversíveis, porém não apresentam o mesmo grau de facilidade

na reversão, que é, para determinada característica, variável em decorrência do grau de juvenildade do material. Assim, pode-se também presumir que maiores mudanças no vigor das minicepas poderiam ser obtidas com a utilização de propágulos com diferentes graus de juvenildade, obtidos pela propagação vegetativa seriada.

### 4.1.3. Vigor radicular no enraizamento de miniestacas

#### 4.1.3.1. Análise de variância

Os resultados da análise de variância das características número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento total de raízes e peso da matéria seca da parte radicular das miniestacas enraizadas aos 10, 15, 20 e 25 dias de idade, nos quatro subcultivos de miniestaquia seriada e quatro clones estudados, encontram-se no Quadro 2.

Quadro 2 – Resultados da análise de variância das características número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), comprimento total de raízes (CTR) e peso da matéria seca da parte radicular (PMSPR) das miniestacas, enraizadas aos 10, 15, 20 e 25 dias de idade, dos quatro subcultivos de miniestaquia seriada e quatro clones de *Eucalyptus grandis*

FV	GL	Quadrados Médios			
		NR <sup>1</sup> (n)	CMR <sup>2</sup> (cm)	CTR <sup>2</sup> (cm)	PMSPR <sup>2</sup> (mg)
----- 10 dias -----					
Clone (Clo)	3	2,19 **	0,19 **	0,50 **	-
Subcultivo (Sub)	3	0,57 **	0,02 *	0,04 <sup>ns</sup>	-
Clo * Sub	9	0,23 **	0,02 *	0,05 **	-
Resíduo	64	0,080	0,007	0,014	-
Média geral	-	1,3	0,9	1,6	-
CV <sub>exp</sub> (%)	-	22,8	19,3	23,5	-
----- 15 dias -----					
Clone (Clo)	3	1,29 **	0,40 **	0,99 **	0,67 **
Subcultivo (Sub)	3	0,34 **	0,07 <sup>ns</sup>	0,21 **	0,10 <sup>ns</sup>
Clo * Sub	9	0,10 <sup>ns</sup>	0,07 *	0,13 **	0,07 <sup>ns</sup>
Resíduo	64	0,070	0,032	0,063	0,060
Média geral	-	2,1	4,3	9,0	8,2
CV <sub>exp</sub> (%)	-	17,1	23,8	27,1	26,4
----- 20 dias -----					
Clone (Clo)	3	1,27 **	0,34 **	0,89 **	0,47 **
Subcultivo (Sub)	3	0,10 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>

Clo * Sub	9	0,1093 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	0,04 *
Resíduo	64	0,093	0,018	0,036	0,022
Média geral	-	2,5	8,0	17,5	14,3
CV <sub>exp</sub> (%)	-	18,2	13,7	15,7	12,6
----- 25 dias -----					
Clone (Clo)	3	1,31 **	0,25 **	0,92 **	0,26 **
Subcultivo (Sub)	3	0,24 *	0,03 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
Clone* Sub	9	0,17 **	0,04 <sup>ns</sup>	0,08 **	0,06 **
Resíduo	64	0,060	0,023	0,035	0,022
Média geral	-	2,8	11,8	24,0	20,3
CV <sub>exp</sub> (%)	-	13,7	13,7	13,8	11,4

<sup>1</sup>/ Dados transformados por  $\text{Log}(X+2)$  e <sup>2</sup>/  $\sqrt{(X+0,5)}$ .

\* e \*\* significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F. ns não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Verificaram-se respostas diferenciadas na interação dos clones e subcultivos em relação à idade de avaliação e características avaliadas, o que demonstra a não-ocorrência de respostas universais das características estudadas como resultado dos tratamentos aplicados. Em relação aos quatro clones estudados, registraram-se diferenças significativas de todas as características avaliadas, em todos os períodos de avaliação.

#### 4.1.3.2. Número de raízes

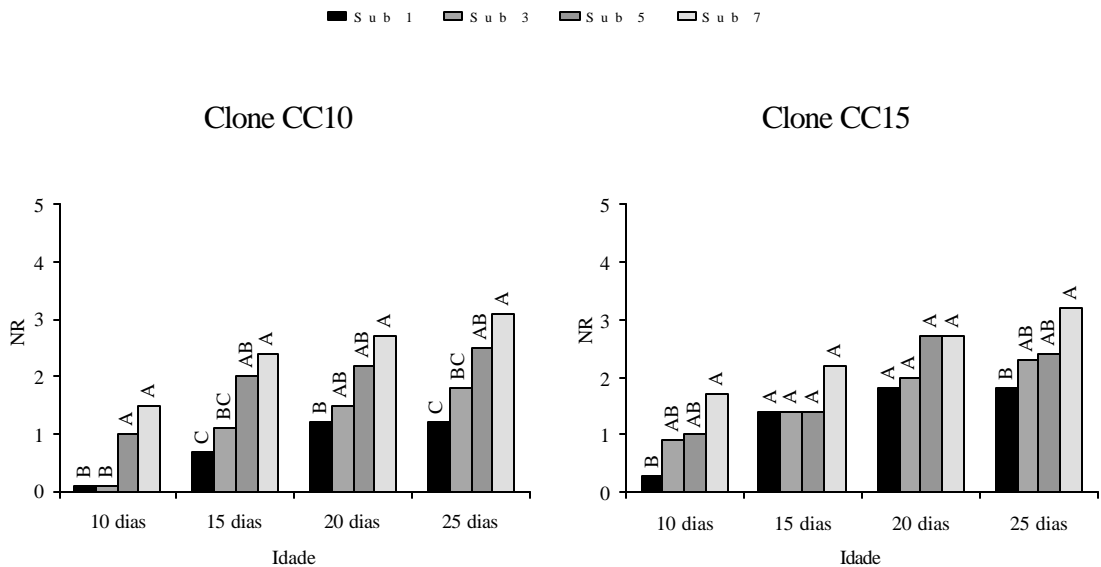
Conforme pode ser visualizado na Figura 5, ocorreu certa tendência de aumento no número de raízes por miniestaca com o maior número de subcultivos, o que está de acordo com SCHNECK (1996). Exceção se faz para o clone CC12, que, de forma geral, apresentou índices de enraizamento superiores aos dos demais, bem como maior número de raízes produzidas. Constatou-se também que o maior número de subcultivos resultou em maior número de raízes em relação aos demais nas avaliações aos 10 dias de permanência em casa de vegetação, indicando maior vigor inicial.

Em relação à iniciação radicular, no clone CC12, aos 10 dias já ocorreu a formação da maioria das raízes, visto que aos 15, 20 e 25 dias de idade dos propágulos ocorreu somente pequeno aumento no número de raízes formadas. Nos outros três clones, notou-se, porém, que aos 10 dias a maior parte das raízes ainda não havia sido



formada, indicando menor vigor radicular desses clones, principalmente nos tratamentos com menor número de subcultivos. Naqueles com maior número de subcultivos, detectou-se tendência semelhante àquela do clone CC12, com maior vigor inicial e, conseqüentemente, formação do maior número de raízes até os 10 dias de idade dos propágulos.

Esses resultados corroboram os de GOMES (1987), GREENWOOD e HUTCHISON (1993) e SCHNECK (1996), segundo os quais, além dos percentuais de enraizamento com o aumento de juvenildade dos propágulos, o maior vigor radicular, resultando em maior número de raízes, também pode ocorrer. Assim, no presente estudo, observou-se a ocorrência de rejuvenescimento dos clones CC10, CC14 e CC15 em relação a essa característica.



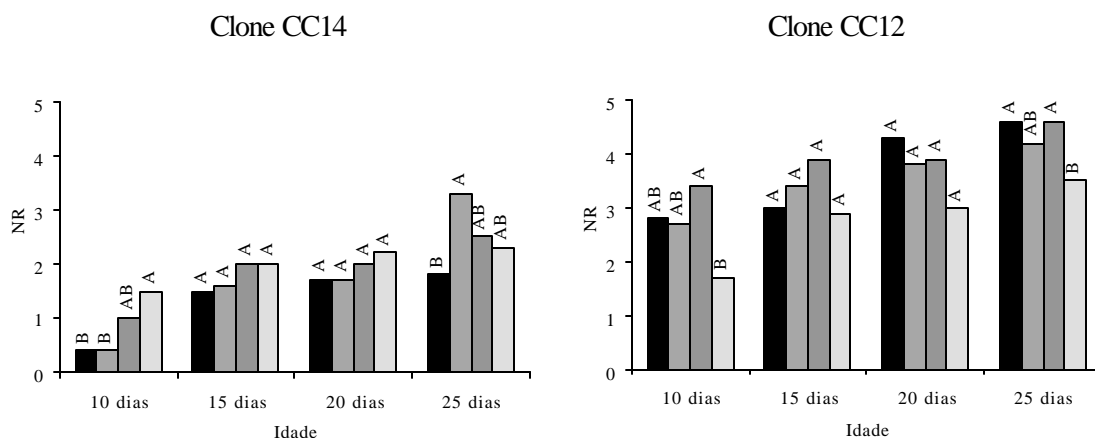


Figura 5 – Médias do número de raízes produzidas por miniestaca (NR) enraizada aos 10, 15, 20 e 25 dias, em função do subcultivo (Sub) e dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.1.3.3. Comprimento da maior raiz

De forma similar ao número de raízes, o clone CC10 apresentou maiores valores de comprimento da maior raiz nos tratamentos com maior número de subcultivos (Figura 6). No entanto, para os demais clones, não se observou tendência geral clara quanto à avaliação de comprimento da maior raiz, em relação aos diferentes subcultivos.

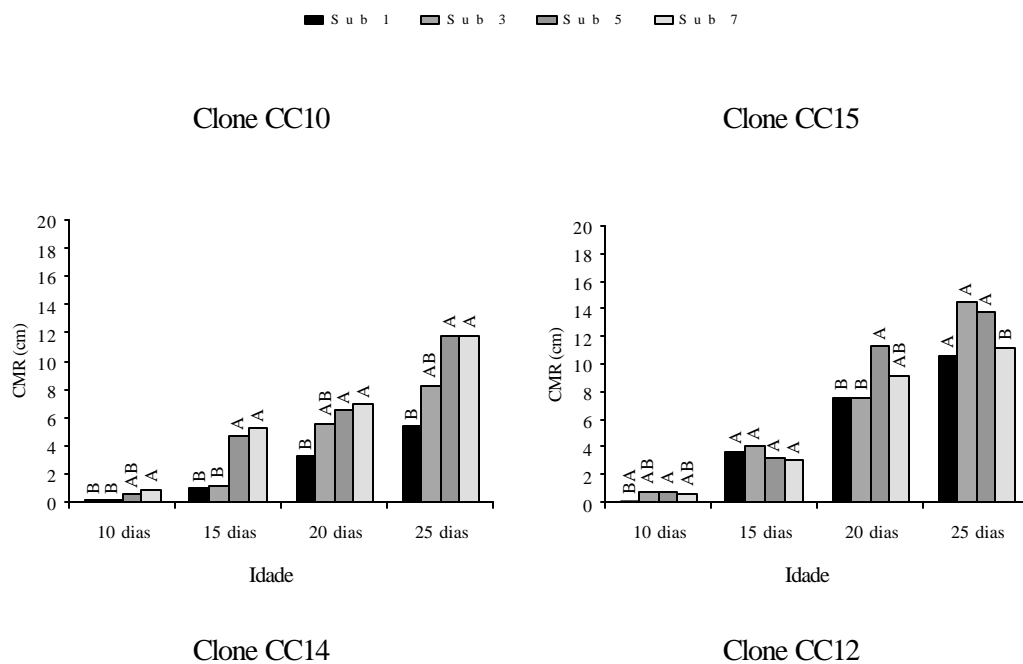
Em termos de comparação dos diferentes clones, percebeu-se a superioridade do clone CC12, denotando a sua grande aptidão à propagação vegetativa e à maior dificuldade de respostas significativas a qualquer técnica ou procedimento de rejuvenescimento, o que concorda com os resultados obtidos por TITON (2001), comparando-se as técnicas de miniestaquia (sem rejuvenescimento) e microestaquia (com rejuvenescimento *in vitro*).

#### 4.1.3.4. Comprimento total de raízes

O clone CC10 apresenta maiores valores de comprimento total de raízes nos tratamentos com maior número de subcultivos (Figura 7), enquanto nos clones CC15 e CC14 não se observou tendência geral dessa característica. Já no clone CC12, dada a sua boa habilidade de propagação vegetativa (item 4.1.4.2, 4.2.3.2. e 4.3.1.2.), os

subcultivos interferiram negativamente no comprimento total de raízes. Tal fato levou à conclusão de que, em materiais mais juvenis, não se têm resultados expressivos em termos de rejuvenescimento pela miniestaquia seriada, o que concorda com os resultados obtidos por TITON (2001) em rejuvenescimento *in vitro*, bem como a possibilidade de influências negativas dos métodos de rejuvenescimento sobre as características avaliadas.

Em termos gerais, as características de vigor radicular aqui avaliadas (número de raízes, comprimento da maior raiz e comprimento total de raízes) indicaram resposta positiva à miniestaquia seriada para o clone ou clones com menor potencial de enraizamento. Esses resultados corroboram os de TITON (2001), que relatou que clones de *Eucalyptus* com menor potencial de enraizamento responderam melhor ao rejuvenescimento *in vitro*.



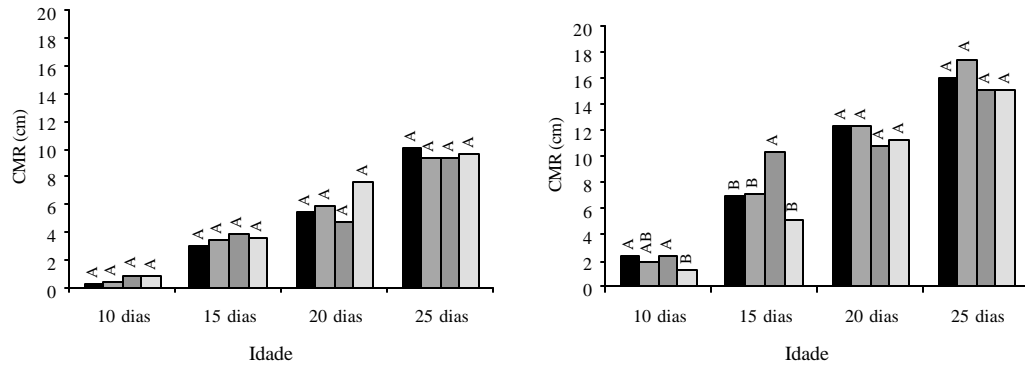
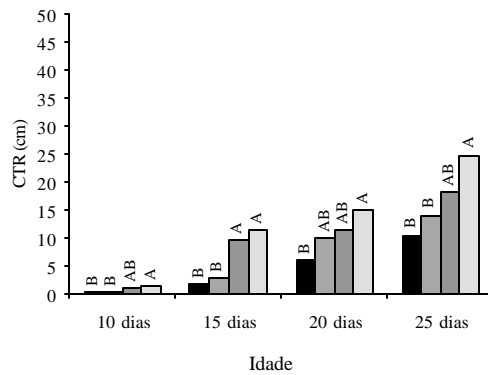


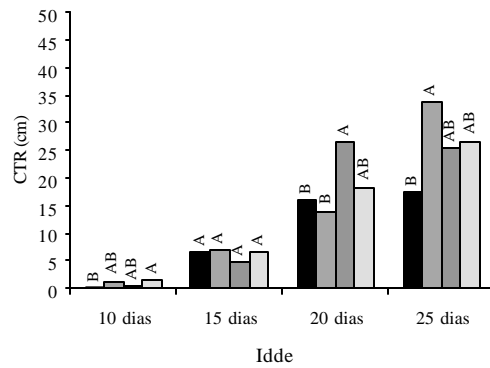
Figura 6 – Médias do comprimento da maior raiz por miniestaca enraizada (CMR) aos 10, 15, 20 e 25 dias, em função do subcultivo (Sub) e dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

■ Sub 1    ■ Sub 3    ■ Sub 5    ■ Sub 7

### Clone CC10



### Clone CC15



### Clone CC14

### Clone CC12

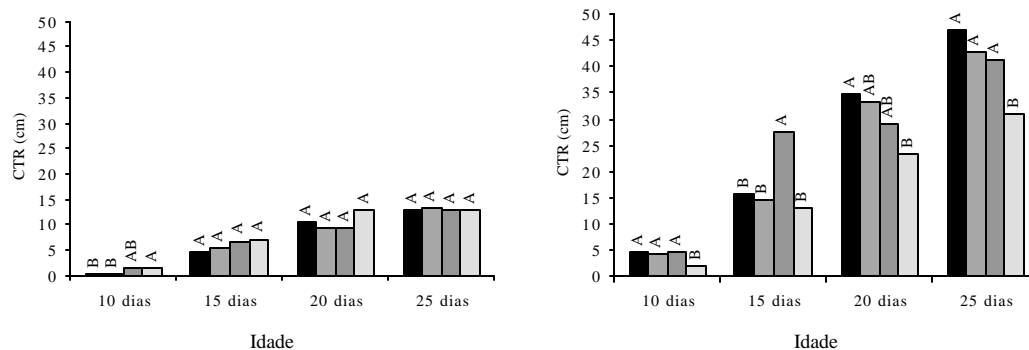


Figura 7 – Médias do comprimento total de raízes por miniestaca (CTR) aos 10, 15, 20 e 25 dias, em função do subcultivo (Sub) e dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A possibilidade de algumas características relacionadas à maturação poderem ser mais facilmente rejuvenescidas que outras, além de a facilidade de rejuvenescimento ser variável conforme a característica (HACKETT e MURRAY, 1993), pode explicar as variações encontradas entre as diferentes características.

#### 4.1.3.5. Peso da matéria seca da parte radicular

Percebe-se, na Figura 8, que o clone CC10 apresentou superioridade significativa de peso da matéria seca da parte radicular nos tratamentos com maior número de subcultivos apenas aos 25 dias de avaliação. No clone CC15 não houve diferença significativa em relação a essa característica, e no clone CC14, aos 20 dias de avaliação, o subcultivo 7 resultou em aumento do peso da matéria seca da parte radicular, não diferindo significativamente dos subcultivos 1 e 3. No entanto, da mesma forma que para número de raízes, comprimento da maior raiz e comprimento total de raízes, o clone CC12 apresentou diminuição do peso da matéria seca da parte radicular, em razão do aumento do número de subcultivos, denotando, novamente, uma não sensibilidade à miniestaquia seriada ou até certa perda de vigor.

De forma geral, analisando o número de raízes (Figura 5), o comprimento da maior raiz (Figura 6), o comprimento total de raízes (Figura 7) e o peso da matéria seca da parte radicular (Figura 8), pôde-se observar que, no clone CC10, os tratamentos com maior número de subcultivos apresentaram tendência de aumento. Nos clones CC15 e CC14, registraram-se respostas variáveis em função de suas características, enquanto no clone CC12, considerado de maior aptidão ao enraizamento, foi verificado tendência de resposta negativa aos subcultivos de miniestaquia seriada. Além disso, o clone CC12 apresentou maior velocidade de enraizamento em relação aos demais, ou seja, maior número de raízes, comprimento da maior raiz e maior comprimento total de raízes aos 10, 15, 20 e 25 dias de idade, o que indica maior vigor inicial e final.

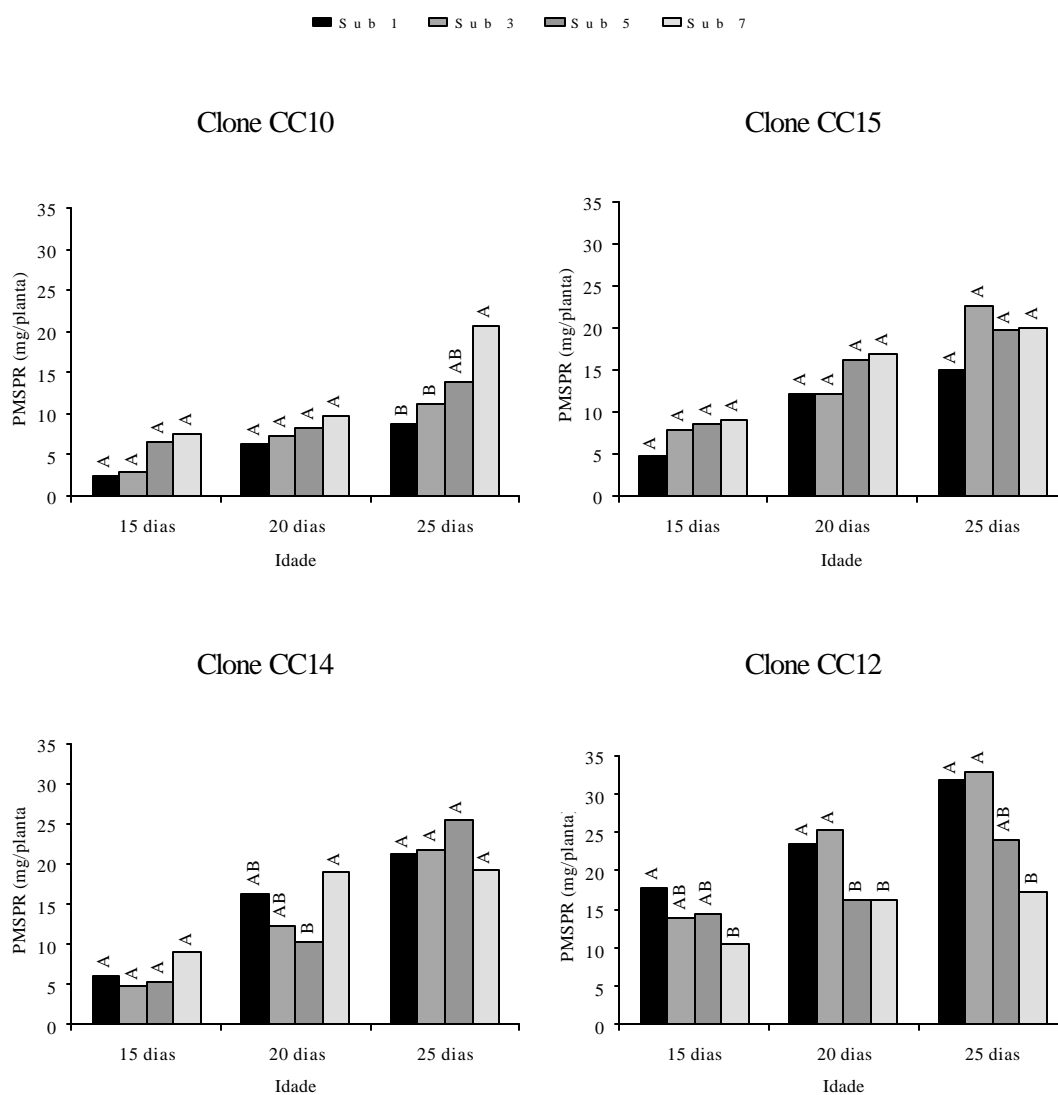


Figura 8 – Médias do peso da matéria seca da parte radicular por miniestaca (PMSPR) aos 15, 20 e 25 dias, em função do subcultivo (Sub) e dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A ocorrência de influências negativas dos métodos de rejuvenescimento no clone de maior juvenilidade (CC12), em algumas características, pode estar relacionada a uma linha de máxima juvenilidade, em que, a partir desta, qualquer método ou técnica de rejuvenescimento não resultaria mais em respostas positivas, ocasionando, em algumas situações, redução no vigor geral dos propágulos em razão dos tratamentos e manejo envolvidos.

#### 4.1.4. Enraizamento, sobrevivência e vigor das miniestacas

##### 4.1.4.1. Análise de variância

Os resultados da análise de variância das características de sobrevivência das miniestacas na saída das casas de vegetação, enraizamento na saída da casa de sombra e sobrevivência, altura, diâmetro de colo e peso da matéria seca da parte radicular e da parte aérea das mudas aos 50 dias de idade encontram-se no Quadro 3.

Registrou-se efeito significativo ( $P < 0,05$ ) na interação dos clones com os subcultivos com relação a SOBSCV, ENRSCS, SOB50, ALT50, DC50 e PMSPA, pelo teste F, indicando diversidade de respostas em relação aos clones e subcultivos.

Os coeficientes de variação experimental ( $CV_{exp}$ ) apresentaram valores entre 4,9 e 15,3% para as características de SOBSCV, ENRSCS, SOB50, ALT50 e DC50 (Quadro 3), sendo esses valores próximos aos padrões encontrados em *Eucalyptus* (SCHMIDT, 1995; XAVIER e COMÉRIO, 1997; WENDLING, 1999; TITON, 2001). Com relação às características de PMSPR e PMSPA, os coeficientes de variação encontrados foram de 28,3 e 25,4%, respectivamente, o que também está de acordo com a literatura quanto a essas características específicas (GOMES, 2001; TITON, 2001).

Quadro 3 – Resultados da análise de variância das características de sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação (SOBSCV), do enraizamento das miniestacas na saída da casa de sombra (ENRSCS), da sobrevivência (SOB50), da altura (ALT50), do diâmetro de colo (DC50), do peso da matéria seca da parte radicular (PMSPR) e da parte aérea (PMSPA) das mudas, aos 50 dias de idade, dos quatro subcultivos e quatro clones de *Eucalyptus grandis*

FV	GL	Quadrados Médios						
		SOBSCV <sup>1</sup> (%)	ENRSCS <sup>1</sup> (%)	SOB50 <sup>1</sup> (%)	ALT50 (cm)	DC50 (mm)	PMSPR (mg)	PMSPA (g)
Clone (Clo)	3	190,15 **	348,64 **	502,72**	58,58**	0,68 *	1394,5 **	0,27**
Subcultivo	3	7,31 ns	23,50 ns	131,88**	1,05 ns	0,32 ns	234,89 ns	0,07 ns
Clo * Sub	9	25,80 *	33,72 *	68,64 **	13,78**	0,43 *	147,23 ns	0,17**
Resíduo	80	21,60	27,50	23,02	4,04	0,17	187,46	0,05
Média geral	-	94,2	83,9	76,4	13,2	1,3	48,3	0,3
$CV_{exp}$ (%)	-	4,9	6,2	6,3	15,3	9,7	28,3	25,4

\* e \*\* significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ns não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>1</sup>/ Dados não transformados em virtude da normalidade apresentada pelo teste de Lilliefors e homogeneidade de variâncias pelos testes de Cochran e Bartlett.

#### 4.1.4.2. Enraizamento e sobrevivência das miniestacas

A sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação não apresentou diferenças entre os subcultivos estudados, com exceção do CC14, em que o subcultivo 1 foi significativamente inferior aos demais (Figura 9A). Isso pode ser um indicativo do bom controle ambiental e de manejo existente no interior da casa de vegetação (IRITANI e SOARES, 1983), impossibilitando a ocorrência dessas diferenças, as quais são mais facilmente visíveis em condições ambientes mais adversas. Esses resultados corroboram os encontrados por XAVIER et al. (2001), segundo os quais, em condições ambientais mais drásticas de temperatura e manejo, ocorreram respostas mais pronunciadas dos efeitos do rejuvenescimento *in vitro* (microestaquia), em termos de sobrevivência, em comparação com a miniestaquia (sem rejuvenescimento).

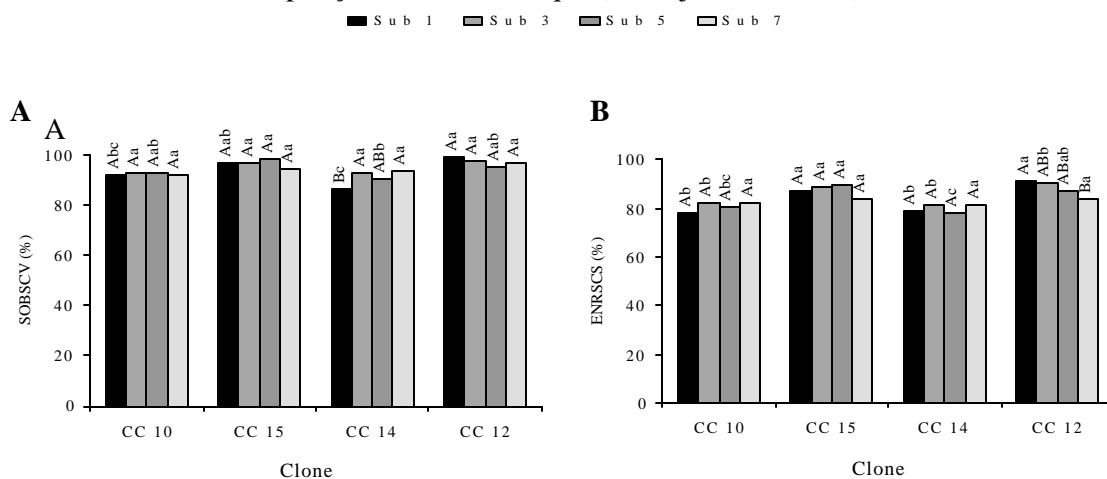


Figura 9 – Médias da sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação (SOBSCV - A) e enraizamento na saída da casa de sombra (ENRSCS - B), em função dos subcultivos (Sub) e clones de *Eucalyptus grandis*. As médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos e de uma mesma letra minúscula entre os clones dentro de cada subcultivo, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando o enraizamento na saída da casa de sombra (Figura 9-B), observou-se o mesmo comportamento daquele na saída da casa de vegetação, porém sem variações entre os subcultivos do clone CC14 e valores de enraizamento significativamente inferiores no subcultivo 7. Em relação aos clones, os de melhor desempenho nesta avaliação foi o CC12, seguido pelo CC15, com médias de 87,8 e 87,1% de enraizamento, respectivamente.

A sobrevivência das mudas aos 50 dias de idade é uma avaliação que já exprime efeito mais drástico do ambiente, sendo mais fácil a ocorrência de diferenças entre os tratamentos e clones. No presente estudo, conforme Figura 10, observaram-se a superioridade do clone CC12 em relação aos demais e um efeito positivo dos subcultivos na sobrevivência das mudas dos clones CC10, CC15 e CC14, sendo o efeito mais pronunciado no clone CC10.



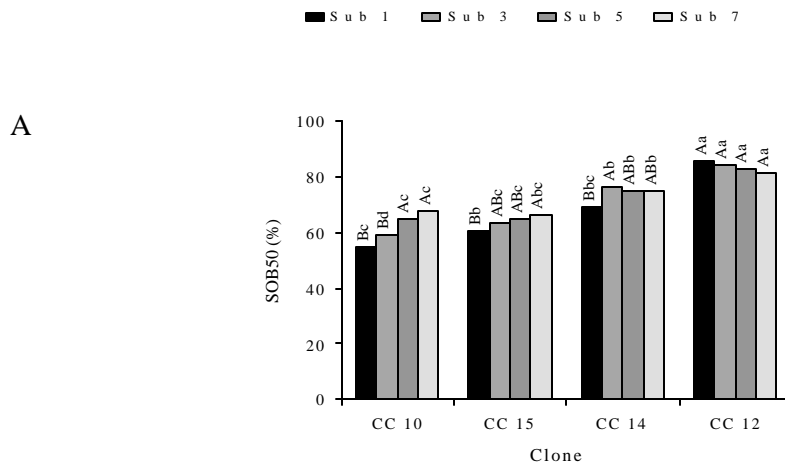


Figura 10– Médias da sobrevivência (SOB50) das mudas aos 50 dias de idade, em função dos subcultivos (Sub) e dos clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos e de uma mesma letra minúscula entre os clones dentro de cada subcultivo não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Essas constatações, de forma similar ao vigor radicular, podem levar à generalização de que materiais de menor grau de juvenilidade e, por conseqüência, com menores índices de enraizamento e sobrevivência respondem melhor ao rejuvenescimento, evidenciando-se a aplicabilidade dessas técnicas somente para clones e espécies de difícil enraizamento, conforme citado por XAVIER et al. (2001). Nos clones CC10 e CC15, talvez maior número de subcultivos poderia resultar em efeitos mais pronunciados.

Outro aspecto a ser considerado no presente estudo é a boa taxa de enraizamento de todos os clones estudados, o que permite concluir que o rejuvenescimento não foi tão eficiente quanto poderia vir a ser, caso os materiais em estudo apresentassem menor capacidade de propagação vegetativa por enraizamento de propágulos.

Em termos de literatura científica, o enraizamento de propágulos ainda tem sido a característica mais aceita para indicar um resultado de rejuvenescimento (GEORGE, 1993; ELDRIDGE et al., 1994; HARTMANN et al., 1997). Baseado nisso, o maior enraizamento resultante dos subcultivos de miniestaquia seriada, principalmente do clone CC10, pode estar associado a um efeito de rejuvenescimento.

Embora os índices de enraizamento e sobrevivência aos 50 dias não tenham mostrado diferenças entre os clones CC10, CC15 e CC14 quanto às características de vigor radicular (item 4.1.3.), notou-se tendência de superioridade dos dois últimos em relação ao primeiro. Isso pode indicar que o grau de juvenilidade desses clones é similar nas características de enraizamento e sobrevivência aos 50 dias de idade, porém é menor no clone CC10, no que tange ao vigor radicular, confirmando um rejuvenescimento diferenciado em razão das características avaliadas, o que está de acordo com HACKETT e MURRAY (1993).

Na silvicultura clonal, um dos critérios adotados para seleção de clones de *Eucalyptus* tem sido o bom índice de enraizamento. Segundo ELDRIDGE et al. (1994), o descarte de clones com baixos índices de enraizamento é importante, uma vez que estes variam de 1 a 90% em híbridos de *Eucalyptus*; após a seleção, com o descarte dos clones piores, índices maiores que 80% podem ser obtidos, viabilizando a clonagem em escala comercial. Esses mesmos autores reconheceram que o número de clones pode ser drasticamente reduzido e clones com bom potencial produtivo e de qualidade podem ser perdidos. Assim, possivelmente, muitos clones com características de interesse excelentes foram descartados dos programas comerciais em vista dos seus baixos índices de enraizamento, levando a certa homogeneização dos materiais empregados na clonagem comercial quanto a essa característica.

#### 4.1.4.3. Altura e diâmetro de colo

No que se relaciona à altura das mudas aos 50 dias (Figura 11-A), notou-se que, de forma similar à sobrevivência aos 50 dias (Figura 10), o clone de maior aptidão à propagação vegetativa (CC12) apresentou resposta negativa aos subcultivos de miniestaquia seriada. No entanto, com o fato de a altura ser uma característica facilmente modificada em função do manejo adotado na produção das mudas (CARNEIRO, 1995), pode-se imaginar efeito dominante dessa ação em relação aos resultados promovidos pelo rejuvenescimento, principalmente quando se trabalha com clones com bom grau de juvenildade, aqui demonstrado pelos bons índices gerais de enraizamento e sobrevivência encontrados, conforme descrito para a sobrevivência das mudas aos 50 dias. Nos demais clones (CC10, CC15 e CC14), não se verificaram variações significativas dos subcultivos de miniestaquia seriada na altura das mudas.

No que se relaciona ao diâmetro de colo das mudas aos 50 dias de idade (Figura 11-B), verificou-se que, de forma similar à altura aos 50 dias (Figura 11-A), o clone de maior aptidão à propagação vegetativa (CC12) mostrou efeito negativo em relação aos subcultivos de miniestaquia seriada, de forma similar a algumas características relacionadas ao vigor radicular no enraizamento de miniestacas (item 4.1.3.). Os demais clones apresentaram certa tendência de resposta positiva aos subcultivos, embora com significância estatística somente para o CC10.

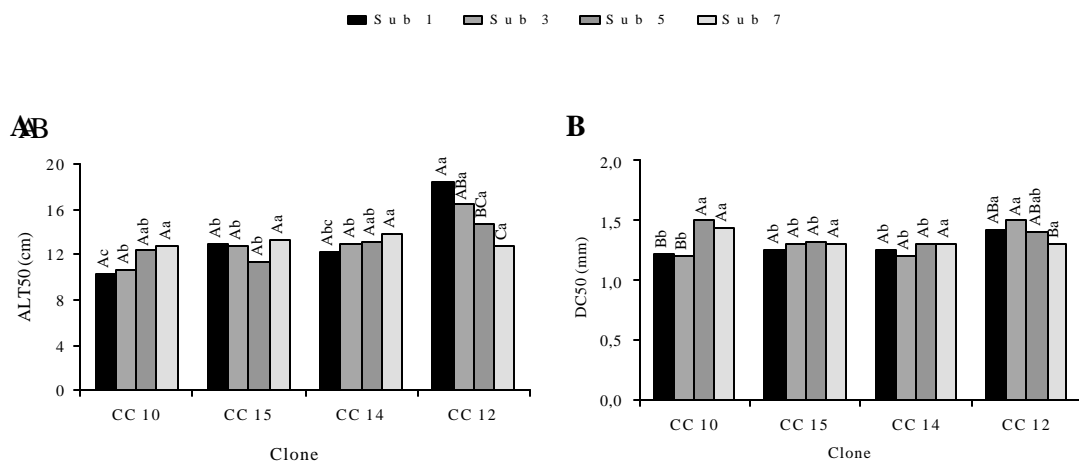


Figura 11 – Médias de altura (ALT - A) e diâmetro de colo (DC50 - B) das mudas aos 50 dias de idade, em função dos subcultivos (Sub) e clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos e de uma mesma letra minúscula entre os clones dentro de cada subcultivo não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para BOLIANI (1986), o estado juvenil possibilita o maior crescimento da planta e a produção de grande superfície foliar, aliada à maior produção de fotoassimilados a serem posteriormente utilizados no crescimento e desenvolvimento das plantas. Essas conclusões podem ser importantes na tentativa de explicar a resposta positiva da miniestaquia seriada sobre o diâmetro de colo das mudas obtidas, principalmente, no clone CC10.

De forma geral, no presente estudo, quando se analisam as características de sobrevivência, altura e diâmetro de colo das mudas aos 50 dias de idade, percebe-se efeito positivo da miniestaquia seriada no rejuvenescimento somente dos clones de *Eucalyptus grandis* com menor aptidão à propagação vegetativa por enraizamento de propágulos. Em clones de boa aptidão à propagação vegetativa, não se observa efeito positivo da miniestaquia seriada, o que concorda com os resultados obtidos por TITON (2001) e XAVIER et al. (2001) para o rejuvenescimento *in vitro*.

#### **4.1.5. Peso da matéria seca das partes aérea e radicular**

De forma geral, no que diz respeito ao peso da matéria seca das partes aérea (Figura 12-A) e radicular (Figura 12-B) das mudas aos 50 dias de idade, não foi observada uma tendência em relação aos subcultivos de miniestaquia seriada. Já no clone CC12, observou-se superioridade significativa dos subcultivos 1 e 3, para peso da matéria seca da parte aérea e diferença não-significativa para peso da matéria seca da parte radicular.

Uma característica associada ao maior grau de juvenilidade dos propágulos consiste em um maior vigor radicular (GOMES, 1987; GREENWOOD e HUTCHISON, 1993; SCHNECK, 1996). No presente estudo, a miniestaquia seriada foi eficiente na promoção de um maior vigor radicular, ou seja, efeito de rejuvenescimento para algumas características, principalmente para os clones CC10 e CC15, confirmando a teoria de que em materiais menos juvenis as técnicas de rejuvenescimento são mais eficazes, dada a maior distância fisiológica do estado atual para o estado juvenil.

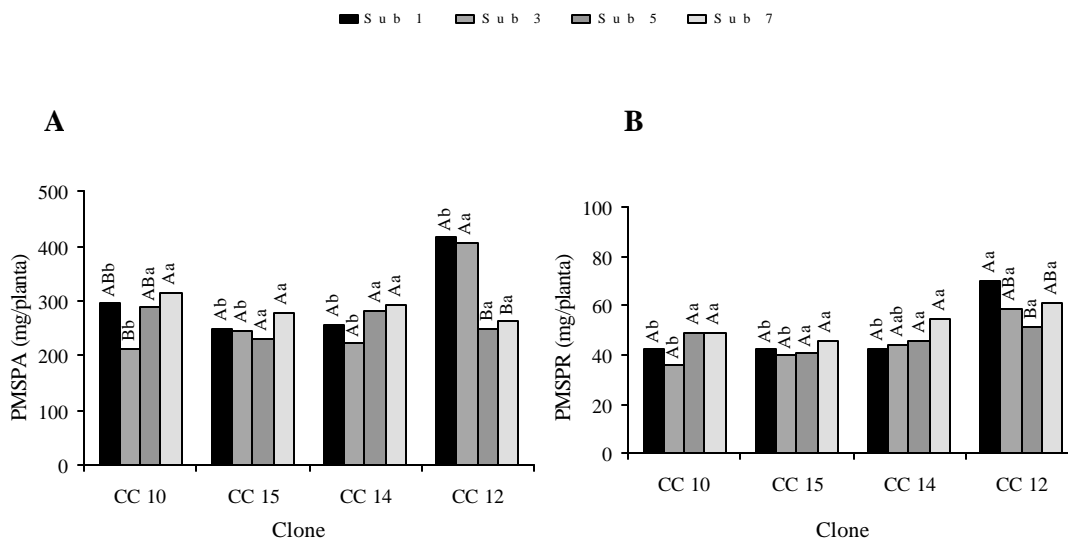


Figura 12– Médias do peso da matéria seca das partes aérea (PMSPA - A) e radicular (PMSPR - B) das mudas aos 50 dias de idade, em função dos subcultivos (Sub) e clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos e de uma mesma letra minúscula entre os clones dentro de cada subcultivo não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 4.2. Rejuvenescimento: miniestaquia seriada x micropropagação

Para os estudos do rejuvenescimento *in vitro* em comparação com aqueles pela miniestaquia seriada, foram utilizados os subcultivos 1 e 7 da miniestaquia seriada e o subcultivo 10 de micropropagação.

### 4.2.1. Vigor das mini e microcepas

No Quadro 4 são apresentados os resultados referentes ao vigor das minicepas dos subcultivos 1 e 7 e das microcepas, avaliado quanto à produção de brotações emitidas em três classes de tamanho, durante as medições realizadas aos 3, 6, 9 e 12 dias, para os clones de *Eucalyptus grandis*.

Quadro 4 – Médias do número de brotações emitidas pelas minicepas dos subcultivos 1 (Sub 1) e 7 (Sub 7) e microcepas (Micro), distribuídas em três classes de tamanho (1, 2 e 3), avaliadas aos 3, 6, 9 e 12 dias, dos dois clones de *Eucalyptus grandis*. As médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de um mesmo clone e idade não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Clone	Idade (dias)	Classes de Tamanho									Total (>0,5 cm)		
		1 (0,5 - 2,0 cm)			2 (2,1 - 4,0 cm)			3 (> 4,0 cm)			Sub 1	Sub 7	Micro
		Sub 1	Sub 7	Micro	Sub 1	Sub7	Micro	Sub1	Sub7	Micro			
CC14	3	10,5A	9,1A	2,9B	1,0A	0,9A	1,6A	0,0A	0,0A	0,0A	11,5A	10,0A	4,6B
	6	11,4A	8,7B	6,1C	4,8A	5,2A	5,9A	0,1A	0,2A	0,4A	16,2A	14,1AB	12,4B
	9	7,9A	8,5A	7,3A	7,2A	7,2A	5,5A	1,7A	1,9A	1,6A	16,7AB	17,6A	14,3B
	12	8,2A	6,8AB	4,8B	6,6A	5,7A	5,8A	3,0B	4,7A	2,9B	17,9A	17,3A	13,4B
CC12	3	11,8A	8,5B	13,0A	2,7A	1,5A	1,7A	0,0A	0,0A	0,0A	14,5A	10,0B	14,7A
	6	9,9AB	8,0B	10,1A	8,7A	6,8B	8,5AB	0,6A	0,4A	0,9A	19,2A	15,2B	19,5A
	9	8,1A	7,1A	8,6A	10,6A	8,4B	9,9AB	1,0A	2,0A	1,5A	19,7A	17,5A	20,0A
	12	7,4A	5,7A	7,5A	7,0AB	6,9B	8,7A	6,4A	4,6B	3,8B	20,8A	17,2B	20,0A

Observa-se que, no clone CC14 na classe de tamanho 1 (0,5 - 2 cm), o número de brotações emitidas foi maior para as minicepas em comparação com as microcepas, aos três e seis dias após a poda drástica, sendo, neste último período, o subcultivo 1 significativamente superior também em relação ao subcultivo 7. Aos nove dias, não se observaram diferenças significativas entre os três tratamentos, e aos 12 dias o subcultivo 1 foi significativamente superior ao da micro e igual ao 7, e na classe 3 (> 4 cm) se observou superioridade significativa do subcultivo 7 em relação aos demais tratamentos. Observando o total de brotações (> 0,5 cm), detectou-se a superioridade das minicepas em relação às microcepas.

No que consiste ao clone CC12, verificou-se inferioridade significativa do subcultivo 7 em relação ao subcultivo 1 e a microcepas, aos três dias após a poda, na classe 1 (0,5 - 2 cm), e a micro mostrou-se superior ao subcultivo 7, aos seis dias. Na classe 2 (2,1 - 4 cm), o subcultivo 1 e as microcepas apresentaram tendência de superioridade, porém, na maioria das vezes, sem diferença significativa em relação ao subcultivo 7, e na classe 3 (> 4 cm) o subcultivo 1 mostrou-se significativamente superior ao dos demais tratamentos aos 12 dias de idade. Analisando o número total de brotações emitidas (> 0,5 cm), observou-se que o subcultivo 7 apresentou valores significativamente inferiores aos demais, aos 3, 6 e 12 dias após a poda.

De forma geral, o número de brotações emitidas pelas microcepas e minicepas dos subcultivos 1 e 7, nos diferentes períodos de mensuração e clones, não apresentou tendência clara de respostas diferenciadas, indicando que as microcepas e minicepas tiveram potencial semelhante para emissão de brotações, o que está de acordo com os resultados encontrados por TITON (2001), nas mesmas condições de clima e manejo.

Os valores de peso da matéria seca das brotações das mini e microcepas, coletadas 12 dias após a poda drástica, encontram-se na Figura 13. Observa-se, nesta figura, que não houve diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, o que está de acordo com a maioria dos resultados obtidos para o número de brotações (Quadro 4).

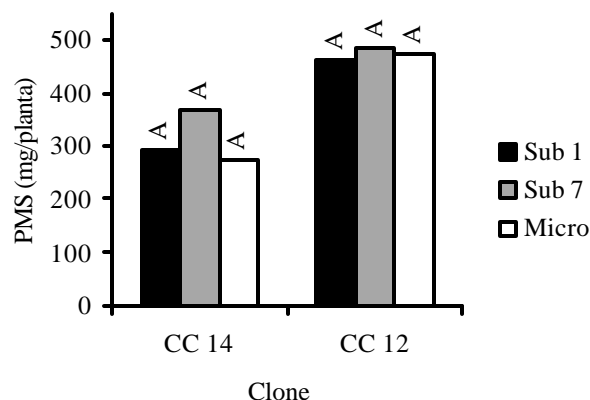


Figura 13– Médias do peso de matéria seca (PMS) das brotações produzidas pelas minicepas dos subcultivos 1 e 7 e microcepas, coletadas no final de 12 dias, dos dois clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra dentro de cada clone entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em suma, no que concerne ao vigor, as microcepas e minicepas dos subcultivos 1 e 7 apresentaram resultados semelhantes, indicando que a capacidade geral de propagação vegetativa dos dois clones estudados é alta e semelhante, bem como um não efeito das técnicas de rejuvenescimento. Assim, não foi possível, então, fazer inferências mais abrangentes quanto à eficiência do rejuvenescimento obtido pela miniestaquia seriada e micropropagação, em relação a essas características.

A possibilidade de ocorrer rejuvenescimento em algumas características e não em outras, aliada aos diferentes graus de rejuvenescimento obtidos (GREWOOD, 1992; HACKETT e MURRAY, 1993), pode ser útil para explicar a falta de resposta, quanto ao vigor das brotações, às técnicas de rejuvenescimento aqui adotadas. Além disso, os clones adotados na presente pesquisa podem apresentar um bom grau de juvenildade em relação às características de vigor das brotações aqui avaliadas, não permitindo respostas expressivas quanto às técnicas de rejuvenescimento adotadas.

#### 4.2.2. Vigor radicular no enraizamento das mini e microestacas

Os resultados da análise de variância das características número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), comprimento total de raízes (CTR) e peso da matéria seca da parte radicular (PMSPR) das miniestacas aos 10, 15, 20 e 25 dias de idade, nos subcultivos 1 e 7 de miniestaquia seriada e num subcultivo *in vitro*, dos dois clones estudados encontram-se no Quadro 5.

Observaram-se comportamentos diferenciados na interação dos clones e subcultivos em relação à idade de avaliação e a características avaliadas, o que demonstra a não-ocorrência de respostas universais das características estudadas em resposta aos tratamentos aplicados.

Quanto ao número de raízes emitidas pelas mini e microestacas na casa de vegetação (Figura 14-A), observaram-se respostas variadas em relação aos clones

estudados e às idades de avaliação. No clone CC14, as miniestacas do subcultivo 7 exibiram maior número de raízes aos 10 dias, porém sem variação

Quadro 5 – Resultados da análise de variância das características número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), comprimento total de raízes (CTR) e peso da matéria seca da parte radicular (PMSPR) das miniestacas, aos 10, 15, 20 e 25 dias de idade, dos subcultivos 1 e 7 de miniestaquia seriada e um subcultivo *in vitro* dos dois clones de *Eucalyptus grandis*

FV	GL	Quadrados Médios			
		NR <sup>1</sup> (n)	CMR <sup>1</sup> (cm)	CTR <sup>1</sup> (cm)	PMSPR <sup>1</sup> (mg)
----- 10 dias -----					
Clone (Clo)	1	20,17 **	11,78 **	55,76 **	-
Subcultivo (Sub)	2	1,32 <sup>ns</sup>	1,84 *	4,91 <sup>ns</sup>	-
Clo * Sub	2	3,89 **	1,49 <sup>ns</sup>	10,76 *	-
Resíduo	24	0,40	0,53	1,93	
Média geral	-	1,8	1,4	2,5	-
CV <sub>exp</sub> (%)	-	34,8	50,6	54,9	-
----- 15 dias -----					
Clone (Clo)	1	15,41 **	180,08 **	952,03 **	452,41 **
Subcultivo (Sub)	2	2,51 <sup>ns</sup>	58,69 <sup>ns</sup>	138,76 *	66,97 <sup>ns</sup>
Clo * Sub	2	0,68 <sup>ns</sup>	37,07 <sup>ns</sup>	79,00 <sup>ns</sup>	77,26 *
Resíduo	24	0,84	20,45	27,91	21,51
Média geral	-	2,6	6,0	12,3	12,2
CV <sub>exp</sub> (%)	-	35,0	74,7	42,9	38,1
----- 20 dias -----					
Clone (Clo)	1	31,62 **	236,88 **	2990,0 **	206,98 <sup>ns</sup>
Subcultivo (Sub)	2	0,96 <sup>ns</sup>	11,24 <sup>ns</sup>	387,07 **	154,68 <sup>ns</sup>
Clo * Sub	2	2,85 <sup>ns</sup>	8,24 <sup>ns</sup>	159,27 <sup>ns</sup>	125,93 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,90	6,69	68,79	56,06
Média geral	-	2,9	9,7	23,8	20,9
CV <sub>exp</sub> (%)	-	32,3	26,5	35,0	35,8
----- 25 dias -----					
Clone (Clo)	1	27,84 **	171,36 **	5429,77 **	164,27 <sup>ns</sup>
Subcultivo (Sub)	2	6,15 *	10,43 <sup>ns</sup>	460,27 **	279,12 *
Clone* Sub	2	1,80 <sup>ns</sup>	6,95 <sup>ns</sup>	162,83 **	95,58 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	1,20	5,21	24,82	70,67
Média geral	-	3,5	13,3	29,0	24,3
CV <sub>exp</sub> (%)	-	31,4	17,2	17,2	34,5

\* e \*\* significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>1/</sup> Dados não transformados em virtude da normalidade apresentada pelo teste de Lilliefors e homogeneidade de variâncias, pelos testes de Cochran e Bartlett.

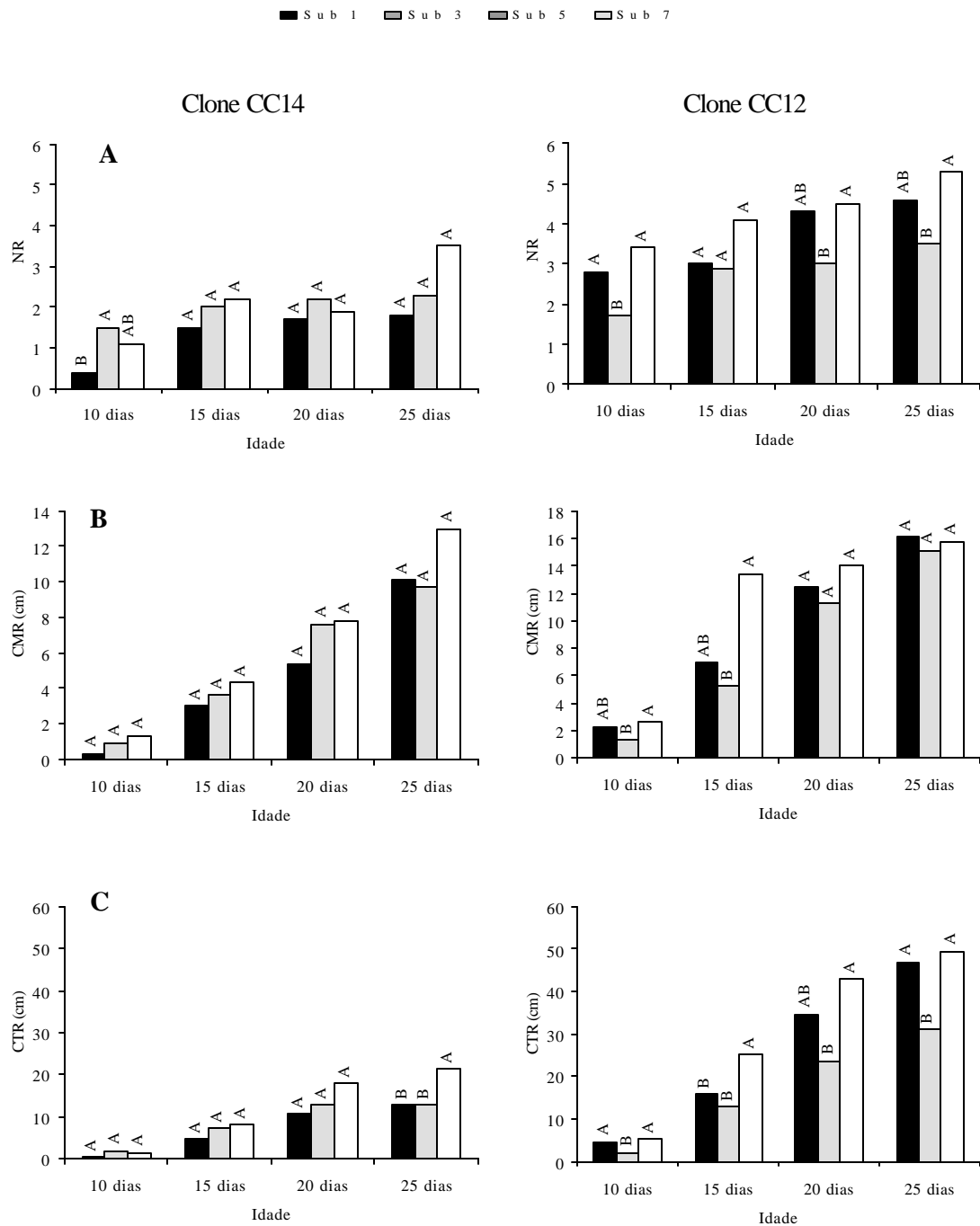


Figura 14– Médias do número de raízes (NR-A), comprimento da maior raiz (CMR-B) e comprimento total de raízes (CTR-C) emitidas por mini e microestaca aos 10, 15, 20 e 25 dias, em função dos subcultivos 1 (Sub 1) e 7 (Sub 7) de miniestaca seriada e do subcultivo *in vitro* (Micro) dos dois clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra dentro de cada clone e idade entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



significativa em relação às microestacas. Quanto ao clone CC12, as microestacas apresentaram tendência geral de superioridade em relação às miniestacas do subcultivo 7, com exceção feita aos 15 dias de avaliação.

Em relação ao comprimento da maior raiz (Figura 14-B), no clone CC12, observou-se superioridade das microestacas em relação às miniestacas, aos 10 e 15 dias, porém sem diferenças significativas em relação ao subcultivo 1. No clone CC14, não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Quanto ao comprimento total de raízes (Figura 14-C) emitidas por mini e microestaca, observou-se que, aos 25 dias, no clone CC14 as microestacas apresentaram diferença significativamente superior em relação às miniestacas dos dois subcultivos. No clone CC12, essa superioridade significativa das microestacas foi observada aos 15 dias, e, aos 10, 20 e 25 dias, tanto as microestacas quanto as miniestacas do subcultivo 1 mostraram-se significativamente superiores em relação às miniestacas do subcultivo 7.

O peso da matéria seca da parte radicular das mini e microestacas enraizadas (Figura 15) não apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos do clone CC14. Já no clone CC12, as miniestacas do subcultivo 7 apresentaram menores pesos de matéria seca em relação às do subcultivo 1 e a microestacas, não evidenciando resposta do rejuvenescimento pela técnica da miniestaquia seriada e da micropropagação a essa característica.

A constatação de que com o aumento do número de subcultivos de miniestaquia ocorre diminuição na produção de matéria seca radicular pelo clone CC12 (com alto potencial de propagação vegetativa) leva à confirmação da hipótese de que, em materiais mais juvenis, a técnica de miniestaquia seriada, bem como a micropropagação, não é eficiente no rejuvenescimento. Além do mais, pode resultar em efeitos negativos nas características de vigor radicular (número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento total de raízes e peso da matéria seca da parte radicular).

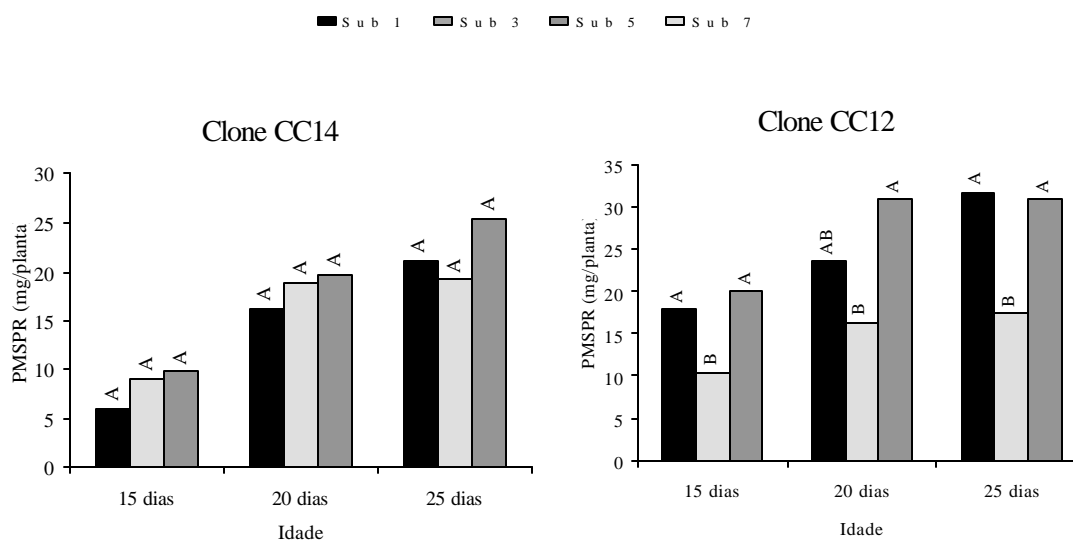


Figura 15– Médias do peso da matéria seca da parte radicular (PMSPR) por mini e microestaca aos 10, 15, 20 e 25 dias, em função dos subcultivos 1 (Sub 1) e 7 (Sub 7) de miniestaquia seriada e do subcultivo *in vitro* (Micro) dos

dois clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra dentro de cada clone e idade entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No clone CC14, que apresenta menor aptidão à propagação vegetativa, mas ainda com índices considerados bons, não ocorrem efeitos negativos e nem positivos da miniestaquia seriada e da micropropagação nas características de vigor radicular aqui estudadas, atestando novamente essa teoria. Resultados similares foram obtidos por TITON (2001) e XAVIER et al. (2001), segundo os quais o clone de menor aptidão à propagação clonal exibiu maior resposta ao rejuvenescimento pelos subcultivos *in vitro* (microestaquia).

De forma geral, pode-se assumir que condições ambientais e nutricionais de cultivo das plantas-matrizes mais próximas das ideais (MENZIES, 1992; MOE, 1987), além de boas condições de enraizamento e de manejo dos propágulos vegetativos, resultam em efeitos positivos no vigor de enraizamento. Assim, no presente estudo, em que as condições ambientais, nutricionais e de manejo dos clones puderam ser consideradas adequadas para propiciar bom vigor radicular, não se obteve efeito significativo de rejuvenescimento. No entanto, quando se trabalha em condições adversas e com clones de maior dificuldade de propagação, o rejuvenescimento pode se tornar mais eficiente em relação às características avaliadas neste item.

#### 4.2.3. Enraizamento, sobrevivência e vigor das mini e microestacas

##### 4.2.3.1. Análise de variância

Os resultados da análise de variância das características de sobrevivência das mini e microestacas na saída da casa de vegetação, enraizamento na saída da casa de sombra e sobrevivência, altura, diâmetro de colo e peso da matéria seca da parte radicular e da parte aérea das mudas aos 50 dias de idade encontram-se no Quadro 6.

Quadro 6 – Resultados da análise de variância das características de sobrevivência das mini e microestacas na saída da casa de vegetação (SOBSCV), do enraizamento na saída da casa de sombra (ENRSCS), da sobrevivência (SOB50), da altura (ALT50), do diâmetro de colo (DC50) e do peso da matéria seca da raiz (PMSPR) e da parte aérea (PMSPA) das mudas aos 50 dias de idade, nos subcultivos 1 e 7 de miniestaquia seriada e num subcultivo *in vitro* nos dois clones de *Eucalyptus grandis*

FV	GL	Quadrados Médios				
		SOBSCV <sup>1</sup> (%)	ENRSCS <sup>1</sup> (%)	SOB50 <sup>1</sup> (%)	ALT50 (cm)	DC50 (mm)
Clone (Clo)	1	307,84 **	503,48 **	961,07 **	41,28 **	0,02 <sup>ns</sup>

Subcultivo (Sub)	2	49,74 *	26,28 <sup>ns</sup>	36,43 <sup>ns</sup>	14,76 <sup>ns</sup>	0,28 **
Clo * Sub	2	75,49 <sup>ns</sup>	76,37 <sup>ns</sup>	68,75 <sup>ns</sup>	33,17 **	0,15 **
Resíduo	24	24,90	23,78	21,09	4,51	0,03
Média Geral	-	95,0	84,6	78,9	13,9	1,4
CV <sub>exp</sub> (%)	-	5,2	5,8	5,8	15,3	11,5

\* e \*\* significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>1/</sup> Dados não transformados em virtude da normalidade apresentada pelo teste de

Lilliefors e homogeneidade de variâncias, pelos testes de Cochran e Bartlett.

Observou-se efeito significativo ( $P < 0,01$ ) na interação clone e subcultivo, quanto às características ALT50 e DC50 e efeito significativo dos clones para todas as características, com exceção do diâmetro de colo das mudas aos 50 dias de idade, em que somente os subcultivos levaram a diferenças significativas, pelo teste F. Já com relação às demais características, não se observaram diferenças significativas em relação aos dois subcultivos de mini e ao de microestaquia. Essa resposta está de acordo com a encontrada na miniestaquia seriada (item 4.1.) dos clones CC14 e CC12, reforçando a idéia de que propágulos com boa capacidade de propagação vegetativa não respondem ao rejuvenescimento.

Os coeficientes de variação experimental apresentaram valores entre 5,2 e 15,3% em todas as características avaliadas (Quadro 6), os quais, segundo dados de literatura disponíveis, estão próximos dos padrões encontrados em *Eucalyptus* (SCHMIDT, 1995; WENDLING, 1999; GOMES, 2001; TITON, 2001).

#### 4.2.3.2. Enraizamento e sobrevivência das mini e microestacas

Quanto à sobrevivência na saída da casa de vegetação (Figura 16-A), detectou-se superioridade das microestacas em relação às miniestacas do subcultivo 1 do clone CC14, porém o enraizamento na saída da casa de sombra (Figura 16-B) não apresentou variações significativas entre os subcultivos 1 e 7 de miniestaquia e a micropropagação.

Considerando a média dos dois clones de *Eucalyptus grandis* estudados, obtiveram-se 95% de sobrevivência na saída da casa de vegetação e 84,6% de enraizamento na saída da casa de sombra, o que evidencia a alta capacidade de propagação vegetativa desses materiais genéticos.

A sobrevivência das mudas aos 50 dias de idade (Figura 17) apresentou comportamento similar àquele encontrado em sobrevivência na saída da casa de vegetação (Figura 16-A) e enraizamento na saída da casa de sombra (Figura 16-B), porém com valores ligeiramente inferiores. Considerando a média de

■ Sub 1   □ Sub 3   ■ Sub 5   □ Sub 7

A<sub>A</sub>

B

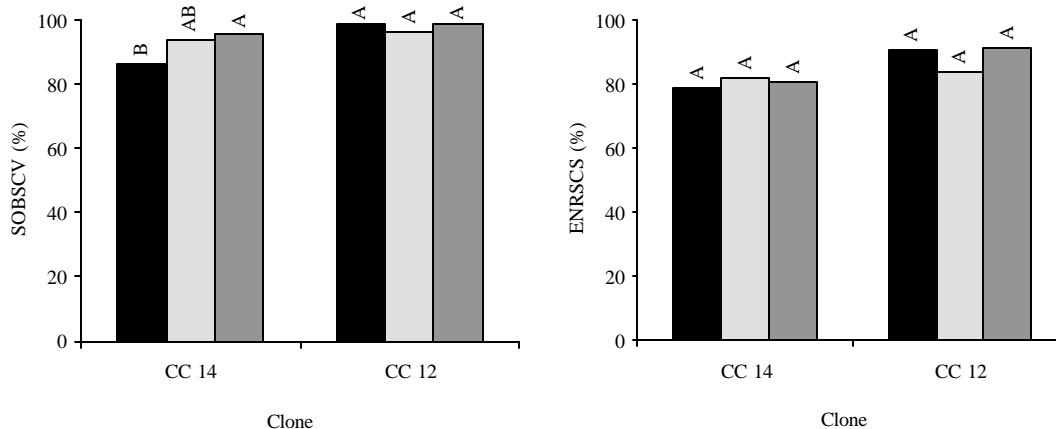


Figura 16– Médias de sobrevivência das mini e microestacas na saída da casa de vegetação (SOBSCV - A) e enraizamento na saída da casa de sombra (ENRSCS - B), em função dos subcultivos 1 (Sub 1) e 7 (Sub 7) de miniestaquia seriada e do subcultivo *in vitro* (micro) dos dois clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

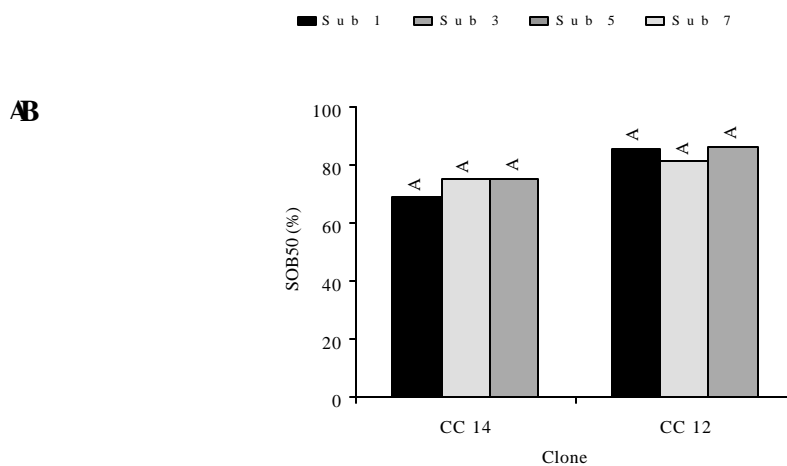


Figura 17– Médias da sobrevivência (SOB50) das mudas aos 50 dias de idade, em função dos subcultivos 1 (Sub 1) e 7 (Sub 7) de miniestaquia seriada e do subcultivo *in vitro* (micro) dos dois clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

sobrevivência, obtiveram-se 73,2 e 84,6% de sobrevivência, respectivamente, dos clones CC14 e CC12. Isso evidenciou uma boa capacidade de propagação vegetativa destes e levou à conclusão de que os clones empregados no presente experimento apresentavam grau de juvenilidade bom com relação a essa característica, não respondendo, portanto, aos diferentes tratamentos de rejuvenescimento, mas corroborando as respostas encontradas por TITON (2001).

Em trabalhos com miniestaquia desenvolvidos por WENDLING et al. (2000a), foram encontrados índices gerais de enraizamento bem menores quando em comparação com aqueles obtidos na presente pesquisa, ou seja, valores entre 14,5 e 65,8%, com média geral dos cinco clones estudados de 36,5%, denotando baixo grau de juvenilidade desses clones ou condições gerais de manejo desfavoráveis.

De forma similar ao vigor radicular no enraizamento das mini e microestacas (item 4.2.2.), pode-se assumir que, em condições ambientais e nutricionais de cultivo das plantas-matrizes mais próximas das ideais (MOE, 1987; MENZIES, 1992), resultam-se, além de boas condições do ambiente de enraizamento e de manejo dos propágulos vegetativos, efeitos positivos nos índices gerais de enraizamento.

Assim, no presente estudo, em que as condições ambientais, nutricionais e de manejo dos clones podem ser consideradas favoráveis para propiciar um bom enraizamento, obtiveram-se bons resultados em ambos os clones e um resultado não-positivo do rejuvenescimento, concordando, também, com as respostas obtidas por TITON (2001), nas mesmas condições gerais de manejo. Aliado a isso, a espécie/clone a ser propagada também tem importância destacada no processo de clonagem (GONÇALVES, 1982; MENZIES, 1992; THOMSON, 1992; ELDRIDGE et al., 1994), levando a crer na boa aptidão genética à propagação vegetativa dos clones CC14 e CC12 estudados e, conseqüentemente, num bom grau de juvenilidade destes, não resultando em sensibilidade desses clones a qualquer técnica de rejuvenescimento.

Já quando se trabalha em condições mais drásticas de ambiente, nutrição e manejo dos clones, bem como com clones menos aptos à propagação vegetativa, os índices gerais de sucesso com a clonagem diminuem drasticamente (MENZIES, 1992; THOMSON, 1992). Nessas condições, o rejuvenescimento com relação a essas características pode se tornar mais eficiente e necessário na obtenção de resultados satisfatórios na propagação clonal de *Eucalyptus*.

#### **4.2.3.3. Altura e diâmetro de colo**

Resultados de pesquisas obtidos por BOLIANI (1986) e GREENWOOD e HUTCHISON (1993) indicam que plantas em estado mais juvenil apresentam maiores potenciais de crescimento vegetativo. No presente estudo, para altura das mudas aos 50 dias de idade (Figura 18-A), observou-se que o clone CC14 não foi influenciado pelas técnicas de rejuvenescimento, porém no clone CC12 os subcultivos 7 e de micropropagação promoveram diminuição na altura das mudas. Isso pode indicar um bom grau de juvenilidade dos clones estudados em relação a essa característica, cujos subcultivos resultaram em diminuição e possível conseqüência do estresse induzido pelos cortes sucessivos dos tecidos, aliado à possível linha de máxima juvenilidade, a

partir da qual não se conseguiu obter respostas positivas de qualquer técnica de rejuvenescimento.

No que se relaciona ao diâmetro de colo das mudas aos 50 dias de idade (Figura 18-B), observou-se que, de forma inversa à altura (Figura 18-A), o clone CC14 foi influenciado pelas técnicas de rejuvenescimento, resultando em maior diâmetro do subcultivo *in vitro*. O clone CC12, novamente, não foi influenciado pelas técnicas de rejuvenescimento, no que tange ao diâmetro de colo.

De forma geral, foi observado que os valores de altura e diâmetro de colo das mudas de *Eucalyptus* estavam um pouco abaixo do padrão considerado ideal para plantio definitivo no campo, ou seja, acima de 2 mm (GUERREIRO e COLLI JUNIOR, 1984). No entanto, cabe salientar que essas características foram avaliadas aos 50 dias de idade das mudas, além de essas serem facilmente modificadas pelas condições de nutrição fornecidas às mudas durante sua permanência em viveiro (CARNEIRO, 1995).

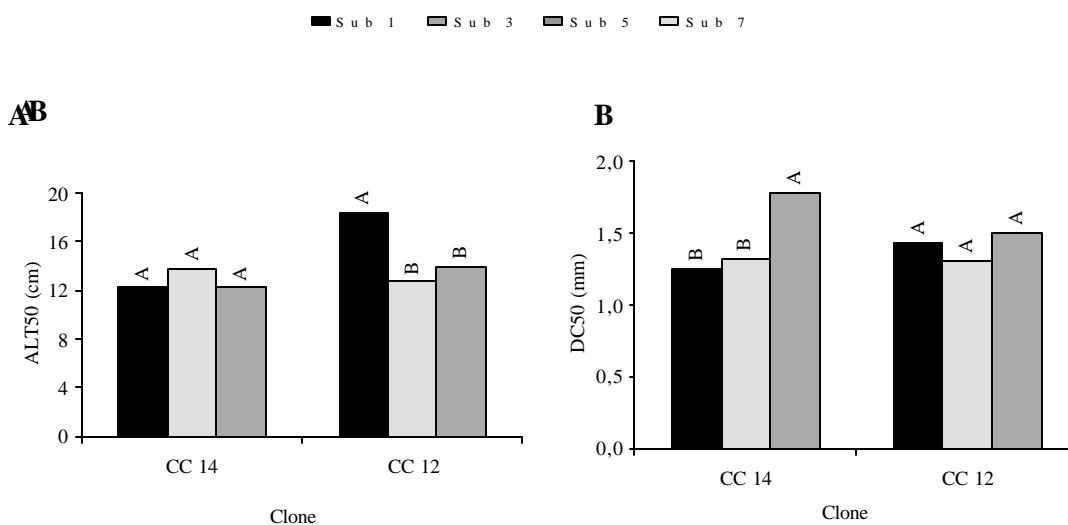


Figura 18– Médias de altura (ALT50 - A) e diâmetro de colo (DC - B) das mudas aos 50 dias de idade, em função dos subcultivos 1 (Sub 1) e 7 (Sub 7) de miniestquia seriada e do subcultivo *in vitro* (micro) dos dois clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados similares foram obtidos por TITON (2001), cujos valores de altura e diâmetro de colo das mudas aos 50 dias variaram, dependendo dos clones, no que tange a respostas ao rejuvenescimento *in vitro* e ao não-rejuvenescimento (miniestquia).

Entretanto, para o clone de menor aptidão à propagação vegetativa, a referida autora citou um possível rejuvenescimento com relação a essas características. Já para XAVIER et al. (2001), apesar de o rejuvenescimento *in vitro* ter resultado em aumento nos índices gerais de sobrevivência e velocidade de enraizamento dos propágulos, não ocorreram respostas às características de altura e diâmetro de colo das mudas aos 85 dias de idade.

### **4.3. Rejuvenescimento: reguladores de crescimento para enraizamento**

#### **4.3.1. Análise de variância**

Os resultados da análise de variância das características de sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação, enraizamento na saída da casa de sombra e sobrevivência, altura, diâmetro de colo e peso seco das partes aérea e radicular das mudas aos 50 dias de idade encontram-se no Quadro 7.

Não houve diferença estatística, pelo teste F ( $P < 0,05$ ), na interação clone x subcultivo x AIB, em todas as características estudadas. Observou-se efeito significativo da interação entre clone e subcultivo em relação às características de sobrevivência e altura aos 50 dias ( $P < 0,01$ ). Já na interação clone e AIB, somente houve significância das características de SOB50, DC50 e PMSPA, enquanto na interação subcultivo e AIB não se observou efeito significativo de nenhuma característica.

#### **4.3.2. Enraizamento e sobrevivência das miniestacas**

Na saída da casa de vegetação (Figura 19), observaram-se valores de sobrevivência próximos a 100% em todos os clones, não havendo diferenças entre os subcultivos de miniestaquia e tampouco entre as dosagens de AIB. Entretanto, os clones CC10 e CC15 apresentaram tendência de queda dos índices gerais de sobrevivência nas dosagens acima de 500 mg L<sup>-1</sup>, indicando um possível efeito de toxidez.

Já na saída da casa de sombra (Figura 20), verificou-se pequena redução nos índices de sobrevivência em relação à saída da casa de vegetação, principalmente nos clones CC10 e CC15. Os clones CC14 e CC12 não apresentaram, novamente, diferenças entre os subcultivos de miniestaquia e entre as diferentes dosagens de AIB; já nos clones CC10 e CC15, notou-se pequena superioridade do subcultivo 7, principalmente em relação aos subcultivos 1 e 3.

Quadro 7 – Resultados da análise de variância das características de sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação

(SOBSCV); do enraizamento das miniestacas na saída da casa de sombra (ENRSCS); da sobrevivência (SOB50); da altura (ALT50) e diâmetro de colo (DC50) das mudas aos 50 dias de idade; e do peso da matéria seca da parte radicular (PMSPR) e da parte aérea (PMSPA) das mudas aos 50 dias de idade, com relação às diferentes dosagens de AIB, dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*

FV	GL	Quadrados Médios						
		SOBSCV <sup>1</sup> (%)	ENRSCS <sup>2</sup> (%)	SOB50 <sup>2</sup> (%)	ALT50 (cm)	DC50 (mm)	PMSPR <sup>3</sup> (mg)	PMSPA <sup>3</sup> (mg)
Clone (Clo)	3	0,26 **	0,43 **	1,83 **	715,53**	3,28**	1,90 **	2,53 **
Subcultivo (Sub)	3	0,08 *	0,03 *	0,63 **	0,93 <sup>ns</sup>	0,14*	0,12 **	0,05 <sup>ns</sup>
AIB	3	0,05 <sup>ns</sup>	0,004 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	0,50 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>
Clo * Sub	9	0,07 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	0,36 **	22,50**	0,62 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>
Clone * AIB	9	0,02 <sup>ns</sup>	0,009 <sup>ns</sup>	0,05 **	6,51 <sup>ns</sup>	0,72*	0,02 <sup>ns</sup>	0,06 *
Sub * AIB	9	0,02 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	3,17 <sup>ns</sup>	0,28 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>
Clone*Sub*AIB	27	0,01 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	2,97 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
Resíduo	256	0,03	0,01	0,02	4,00	0,36	0,03	0,03
Média Geral	-	94,4	87,7	71,6	14,5	1,5	101,3	277,9
CV <sub>exp</sub> (%)	-	11,58	9,17	13,7	13,74	12,18	8,36	7,05

\* e \*\* significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ns não-significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste F.

<sup>1/</sup> Dados transformados por  $\arcsen \sqrt{\left(\frac{X}{100}\right)}$ , <sup>2/</sup> Dados transformados por  $\arcsen$

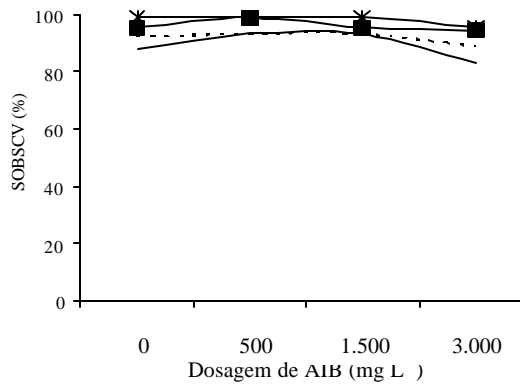
$$\sqrt{\left(\frac{X}{100} - 0,1\right)}$$
 e

<sup>3/</sup> Dados transformados por  $\text{Log}_{10}(X + 20)$ .

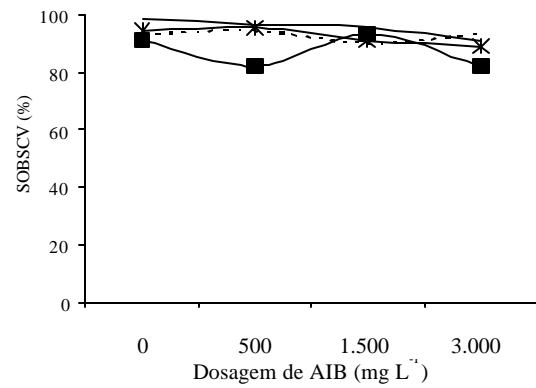
—■— Sub 1    —\*— Sub 3    - - - - - Sub 5    — Sub 7



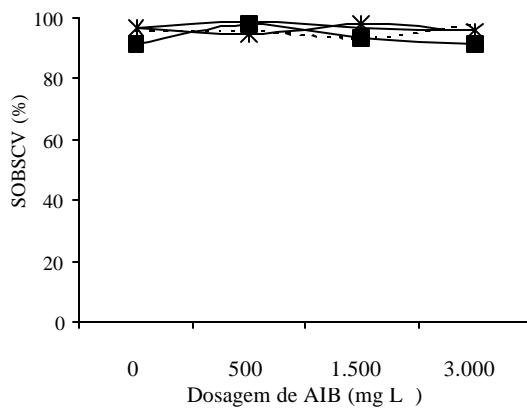
Clone CC10



Clone CC15



Clone CC14



Clone CC12

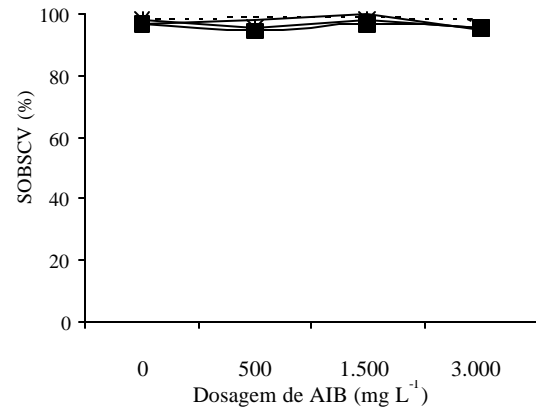


Figura 19– Médias de sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação (SOBSCV), em resposta à aplicação de AIB (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>), dos quatro subcultivos dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*.

—■— Sub 1    —\*— Sub 3    - - - - Sub 5    — Sub 7

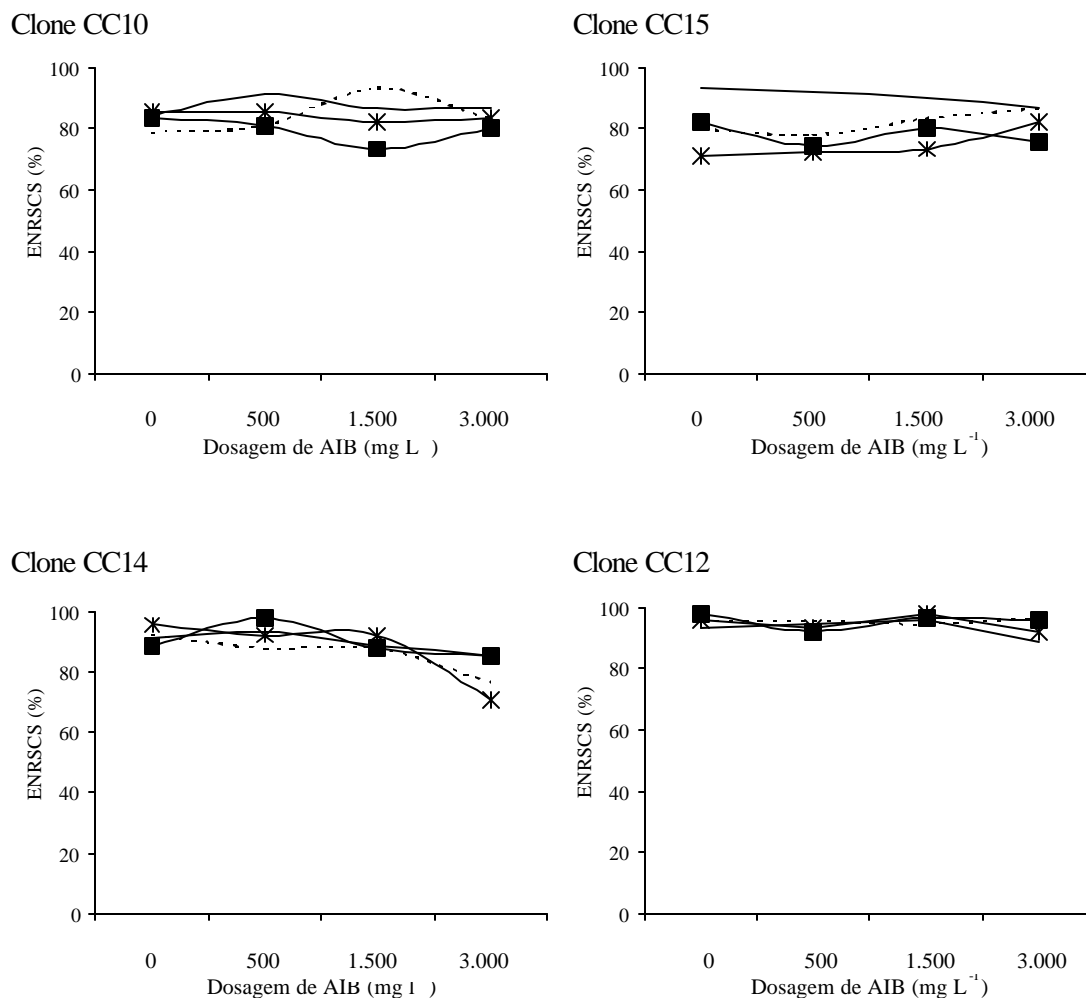


Figura 20– Médias de enraizamento das miniestacas na saída da casa de sombra (ENRSCS), em resposta à aplicação de AIB (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>), dos quatro subcultivos dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*.

Como pode ser visualizado na Figura 21, os índices de sobrevivência das mudas aos 50 dias mostraram-se similares àqueles apresentados no experimento de miniestaquia seriada (item 4.1.4.2.), porém com maior efeito dos subcultivos de miniestaquia seriada dos clones CC10 e CC15 (considerados de menor grau de juvenildade). Esses resultados podem indicar efeito de rejuvenescimento mais eficiente nas condições deste experimento, ou seja, miniestacas com piores condições de vigor na hora da coleta, levando à suposição de que a miniestaquia seriada pode ser mais eficiente quando em condições mais drásticas de manejo.

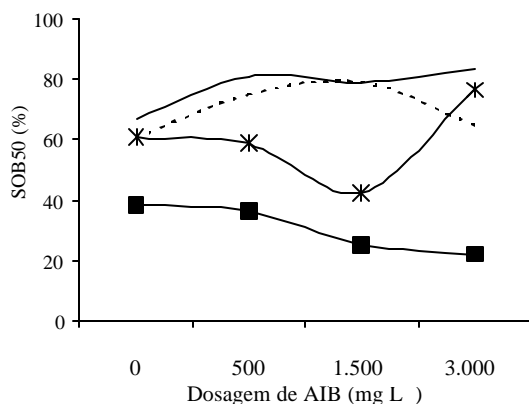
Na média, os clones CC10 e CC15 foram os que apresentaram maior redução nos valores de sobrevivência aos 50 dias de idade, em relação aos da saída da casa de sombra. Esses comportamentos podem estar relacionados aos efeitos de maiores estresses hídrico e lumínico encontrados na área de aclimação, podendo-se supor que os tratamentos com maior número de subcultivos resultaram em maior resistência às condições ambientais adversas desses clones com menor grau de juvenildade.

A miniestaquia seriada foi eficiente na promoção de maiores índices de sobrevivência aos 50 dias de idade das mudas, independentemente das dosagens de AIB aplicadas, somente dos clones CC10 e CC15. No clone CC10, a média geral de sobrevivência foi de 45,1% nos subcultivos 1 e 3 e 73,7% nos subcultivos 5 e 7, resultando em 28,6% de aumento na taxa de sobrevivência destes últimos. No clone CC15, os subcultivos 1 e 3 apresentaram valores de 47,8% de sobrevivência e os de número 5 e 7, valores de 76,3%, resultando em 28,4% de aumento na sobrevivência.

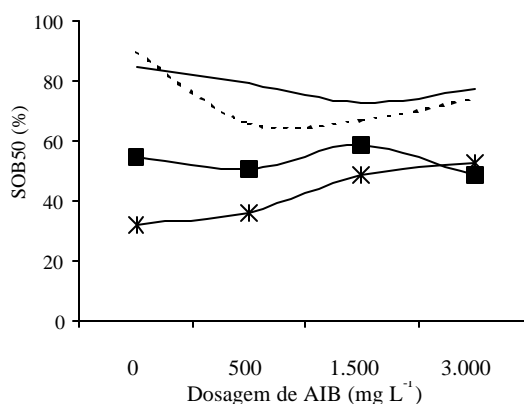
Comparando os resultados de sobrevivência em termos de clones, observou-se, claramente, a superioridade do clone CC12 em relação aos demais, seguido pelo clone CC14. Nesses dois clones, novamente não se observaram efeitos dos subcultivos de miniestaquia seriada sobre o rejuvenescimento, uma vez que, como citado anteriormente, são clones com bom grau de juvenildade, concordando com os resultados de TITON (2001) e XAVIER et al. (2001).

■ Sub 1   \* Sub 3   - - - - Sub 5   — Sub 7

Clone CC10



Clone CC15



Clone CC14

0   500   1.500   3.000

Clone CC12

0   500   1.500   3.000

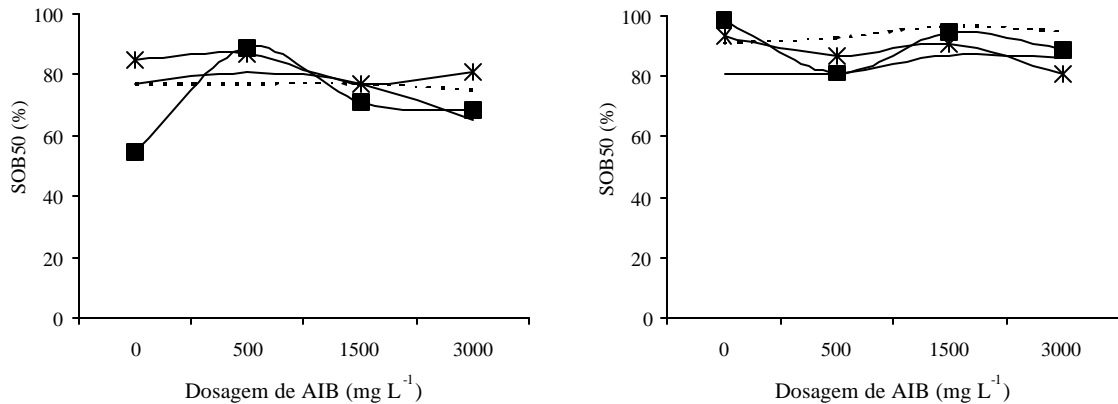


Figura 21 – Médias de sobrevivência das mudas aos 50 dias (SOB50), em resposta à aplicação de AIB (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>), dos quatro subcultivos dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*.

No que tange à aplicação de AIB, não se observaram efeitos das diferentes dosagens em relação à sobrevivência dos clones CC14 e CC12. Já nos clones CC10 e CC15, observaram-se respostas diferenciadas à aplicação de AIB, não havendo, entretanto, tendência clara de efeito positivo ou negativo. Tais resultados são contrários aos encontrados em miniestaqueia por WENDLING (1999), em que a dosagem ao redor de 1.000 mg L<sup>-1</sup> foi a mais eficiente, e por TITON (2001), com maior eficiência das dosagens entre 1.000 e 2.000 mg L<sup>-1</sup> nos clones de *Eucalyptus*.

De acordo com ALVARENGA e CARVALHO (1983) e HARTMANN et al. (1997), quando a auxina é aplicada em estacas ocorre aumento da sua concentração, o que produz efeito estimulador na indução de raízes até um ponto máximo, a partir do qual qualquer acréscimo no nível de auxina se torna inibitório. Assim, no presente estudo, provavelmente a concentração interna de auxina foi suficiente para promover a indução das raízes, embora os índices gerais de enraizamento tenham sido mais baixos nos clones CC10 e CC15, o que pode ser uma possível consequência de um menor vigor dos propágulos. Foi observado efeito inibitório no clone CC10 no subcultivo 1, nas dosagens maiores de 500 mg L<sup>-1</sup>, e no subcultivo 5, acima de 1.500 mg L<sup>-1</sup>; e no clone CC15, nos subcultivos 5 e 7, nas dosagens acima de 500 mg L<sup>-1</sup>.

Os materiais mais juvenis, no entanto, não necessitam de aplicações exógenas de AIB para incrementar o enraizamento (ASSIS et al., 1992; COMÉRIO et al., 1996; XAVIER e COMÉRIO, 1996). Assim, no presente estudo, em que não se observaram efeitos positivos da aplicação de AIB sobre a sobrevivência e enraizamento das miniestacas, pode-se admitir que as relações hormonais internas foram favoráveis para promover um bom enraizamento.

### 4.3.3. Altura e diâmetro de colo

Em termos de altura e diâmetro de colo das mudas aos 50 dias de idade, conforme Figuras 22 e 23, respectivamente, notou-se a clara superioridade dos clones CC14 e CC12 em relação aos demais.

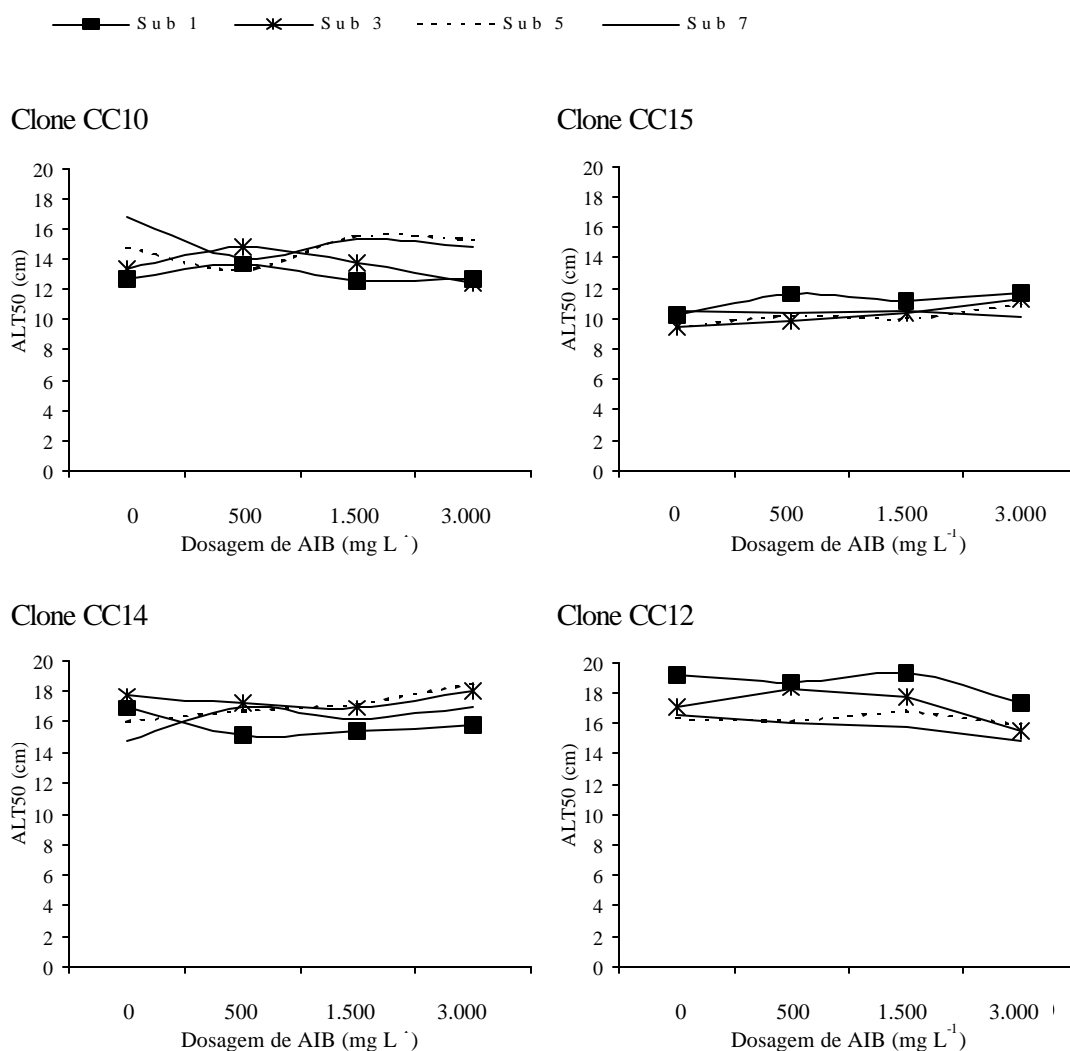


Figura 22– Médias de altura das mudas aos 50 dias (ALT50), em resposta à aplicação de AIB (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>), em relação aos quatro subcultivos dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*.

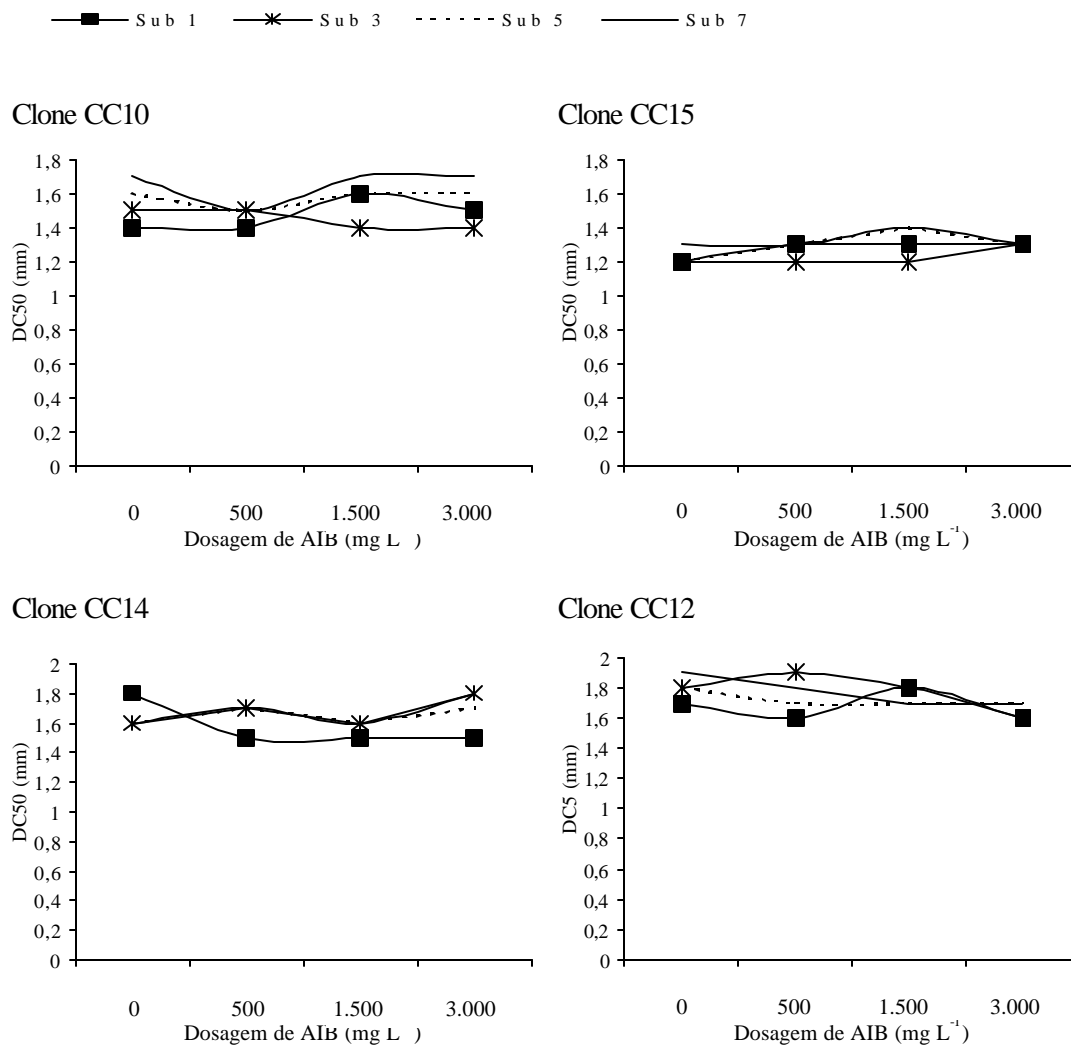


Figura 23– Médias de diâmetro de colo das mudas aos 50 dias (DC50), em resposta à aplicação de AIB (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>), em relação aos quatro subcultivos dos clones de *Eucalyptus grandis*.

Nos subcultivos de miniestaqueia seriada, no que se refere à altura das mudas aos 50 dias, observou-se que o clone de maior aptidão à propagação vegetativa (CC12) mostrou certa resposta negativa à aplicação de AIB. Porém, o fato de a altura ser uma característica facilmente modificada, em razão do manejo adotado na produção das

mudas (CARNEIRO, 1995), pode resultar em efeito dominante dessa ação em relação aos resultados promovidos pelo rejuvenescimento, principalmente quando se trabalha com clones com bom grau de juvenildade. Esta característica foi aqui demonstrada pelos altos índices de enraizamento e sobrevivência encontrados no clone CC12, conforme descrito com relação à sobrevivência das mudas aos 50 dias.

Quanto aos demais clones, nos quatro subcultivos de miniestaquia seriada não foram observadas diferenças de crescimento, levando à confirmação da teoria de HACKETT e MURRAY (1993) de que o rejuvenescimento ocorre em termos relativos e não absolutos. Isso porque algumas características relacionadas à maturação são mais facilmente rejuvenescidas que outras, o que pode ser visualizado pelos índices de sobrevivência, aos 50 dias, dos clones CC10 e CC15 (item 4.3.1.2.).

No que se refere ao diâmetro de colo das mudas aos 50 dias de idade, não foram observados efeitos dos subcultivos de miniestaquia seriada. Segundo CARNEIRO (1995), esta também é uma característica facilmente modificada em função do manejo adotado na produção das mudas, podendo novamente ter resultado em efeito dominante dessa ação em relação aos resultados promovidos pelo rejuvenescimento.

Já no que tange ao regulador de crescimento AIB, novamente não se observaram efeitos das diferentes dosagens, tanto da característica de altura das mudas aos 50 dias quanto do diâmetro de colo, concordando com os resultados obtidos por WENDLING (1999) e TITON (2001).

#### **4.3.4. Peso da matéria seca da parte aérea**

Os subcultivos de miniestaquia seriada resultaram em maior peso de matéria seca da parte aérea das mudas (Figura 24) somente do clone CC10, em que os subcultivos de número 5 e 7 resultaram em aumento de 35,5% em relação aos de números 1 e 3. Já no clone CC12, houve aumento de 9,1% no peso de matéria seca da parte aérea dos subcultivos 1 e 3 em relação aos de números 5 e 7. Esses resultados estão de acordo com os encontrados para as demais características, em que o clone CC10, de menor grau de juvenildade, apresentou sempre uma resposta positiva à miniestaquia seriada.

Segundo GREENWOOD e HUTCHISON (1993), propágulos juvenis não somente produzem maior crescimento do caule, mas também maior quantidade de folhas e biomassa. O estágio juvenil possibilita o maior crescimento vegetativo da planta e a produção de grande área foliar, como também a produção de fotoassimilados (BOLIANI, 1986). Baseado nessas considerações e em razão da resposta positiva ao rejuvenescimento somente do clone CC10 e negativa do clone CC12, pode-se concluir que o segundo apresentava um grau de juvenildade bom para a característica vigor aéreo, não respondendo à miniestaquia seriada; o primeiro, com grau de juvenildade menor, respondeu aos subcultivos.

Essas constatações, de forma similar ao item 4.1. (rejuvenescimento: miniestaquia seriada), podem estar relacionadas à ocorrência de uma linha de máxima juvenildade, em que, a partir desta, qualquer método ou técnica de rejuvenescimento não resultaria mais em respostas positivas, ocasionando em algumas situações, redução do vigor geral dos propágulos em razão dos tratamentos e manejo envolvidos e do possível efeito dos estresses induzidos pelos sucessivos cortes dos tecidos em material juvenil.

Quanto ao AIB, de forma geral, não se verificou influência positiva sobre o peso da matéria seca da parte aérea. Entretanto, nos clones CC10 e CC15, um efeito inibitório dessa característica pôde ser observado a partir da dosagem de 1.500 mg.L<sup>-1</sup> e, no clone CC12, a partir de 500 mg.L<sup>-1</sup>.

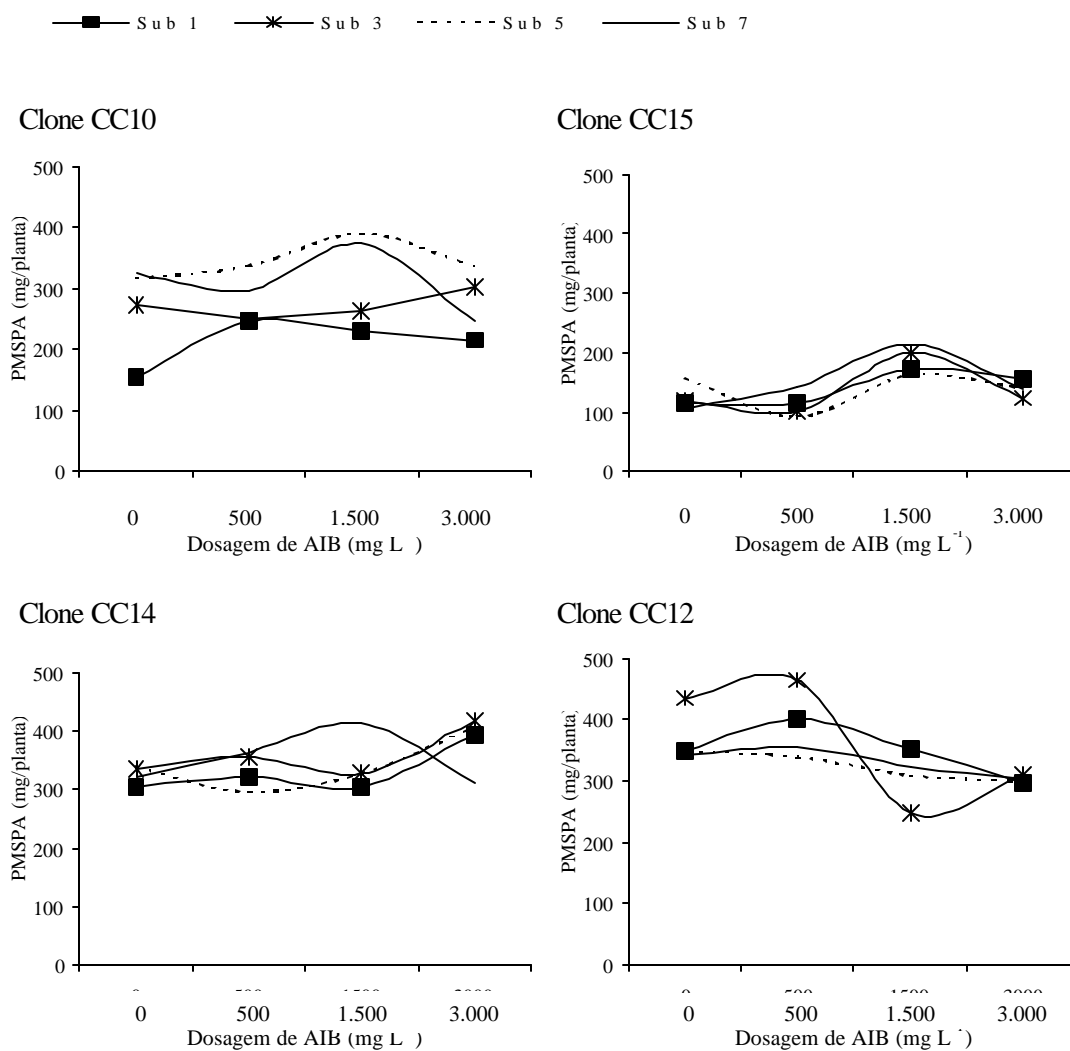


Figura 24– Médias de peso da matéria seca da parte aérea das mudas aos 50 dias (PMSPA), em resposta à aplicação de AIB (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>), em relação aos quatro subcultivos dos clones de *Eucalyptus grandis*.



#### 4.3.5. Peso da matéria seca da parte radicular

De maneira geral, o subcultivo 7 de miniestaquia seriada resultou em maior peso de matéria seca da parte radicular das mudas (Figura 25) dos clones CC10, CC15 e CC14, em que se verificaram aumentos médios de 37, 49,1 e 30,3%, respectivamente, em relação às médias dos subcultivos de números 1, 3 e 5. Já no clone CC12, praticamente não se observaram diferenças entre os subcultivos. Esses resultados estão de acordo com os de TITON (2001), segundo a qual os propágulos rejuvenescidos *in vitro*, de maneira geral, resultaram em maior peso de matéria seca da parte radicular.

Nos clones CC10, CC15 e CC14, não se observaram efeitos das diferentes dosagens de AIB no peso da matéria seca da parte radicular; no clone CC12, um efeito tóxico pôde ser observado com a aplicação dessas dosagens (Figura 25).

As auxinas exercem papel importante na diferenciação de meristemas, para que a formação de raízes adventícias possa ocorrer (HARTMANN et al., 1997). Além disso, outros fatores ambientais também contribuem para essa ação, permitindo supor que, quando os fatores ambientais aliados aos reguladores de crescimento internos responsáveis pela formação de raízes falharem em induzir a diferenciação ou o fizerem em taxas restritas, os reguladores exógenos atuarão complementando a diferenciação.

Com base no exposto, pode-se inferir que, no presente estudo, tanto os reguladores de crescimento internos quanto os fatores ambientais encontravam-se em níveis adequados. Isso pode ser visualizado pelos bons índices gerais de enraizamento, de sobrevivência e vigor radicular obtidos, além do não-efeito geral da aplicação do regulador de crescimento AIB sobre as características avaliadas. Além disso, segundo VAN STADEN e HARTY (1987) e Skoog e Tsui (1951), citados por CUQUEL (1992), altas relações internas de auxina/citocinina, características de plantas mais juvenis, promovem a formação de primórdios radiculares; relações intermediárias promovem a formação de calo, e em relações baixas não existem nem formação de calo nem enraizamento, apenas formação de gemas foliares.

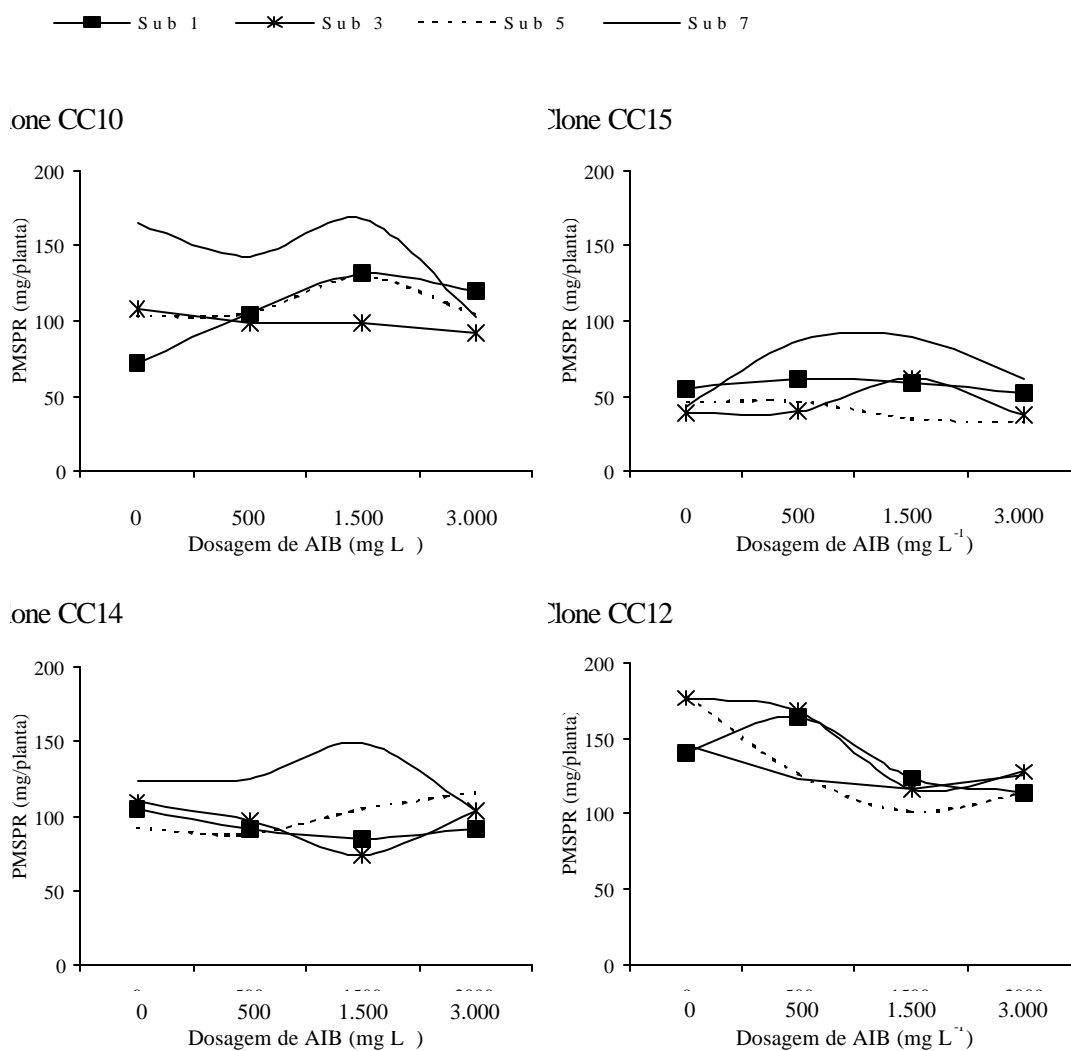


Figura 25– Médias de peso da matéria seca da parte radicular das mudas aos 50 dias (PMSPR), em resposta à aplicação de AIB (0, 500, 1.500 e 3.000 mg L<sup>-1</sup>), em relação aos quatro subcultivos dos clones de *Eucalyptus grandis*.

Tudo isso ajuda a atestar a hipótese de um bom grau de juvenilidade dos clones empregados neste estudo, o que está de acordo com XAVIER e COMÉRIO (1996), segundo os quais propágulos rejuvenescidos pela micropropagação seriada não deram resposta ao AIB aplicado na técnica de microestaquia, resultando até em efeito inibitório. A adoção da técnica de miniestaquia em detrimento da de estaquia levou à redução (WENDLING et al., 2000b; TITON, 2001) e, em alguns casos, até a eliminação total do uso de reguladores de crescimento para enraizamento de *Eucalyptus*, sendo outro fator importante na avaliação dos efeitos do AIB no presente estudo.

Comparando a sobrevivência das mudas obtida no experimento de rejuvenescimento pela miniestaquia seriada (item 4.1.4.2.) com aquela obtida no experimento com utilização do regulador de crescimento AIB (item 4.3.1.2.), percebeu-se que este último apresentou maiores variações entre os subcultivos e, de forma geral, estes foram mais eficientes no rejuvenescimento. Isso pode ser devido ao fato de que, como no experimento com AIB, houve a necessidade da utilização de maior volume de brotações, em vista do maior número de tratamentos, resultando no aproveitamento de propágulos menos vigorosos em todos os tratamentos e repetições. Tal constatação levou à suposição de que, em condições mais drásticas de vigor dos propágulos, a miniestaquia seriada pode vir a ser mais eficiente no rejuvenescimento do que quando em condições ideais de vigor.

Em todas as características avaliadas no item 4.3. (reguladores de crescimento para enraizamento), os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) nas análises de regressão apresentaram valores extremamente baixos, não denotando confiabilidade das equações de regressão para explicar as respostas das características avaliadas em razão das aplicações de AIB.

#### **4.4. Rejuvenescimento: peroxidase e teor de fenóis totais**

A hipótese adotada na presente pesquisa foi de que podem ocorrer variações na atividade total de peroxidase e no teor de fenóis totais nas miniestacas oriundas de diferentes subcultivos de miniestaquia, bem como entre os diferentes clones estudados, o que poderia resultar em marcadores bioquímicos de juvenildade dos propágulos e, conseqüentemente, do potencial rizogênico do material vegetal.

Conforme os resultados da análise de variância (Quadro 8), observou-se interação significativa dos clones e subcultivos em relação à atividade total da enzima peroxidase e do teor de fenóis totais.

Quadro 8 – Resultados da análise de variância da atividade total da enzima peroxidase e teor de fenóis totais em miniestacas, nos diferentes subcultivos de miniestaquia seriada dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*

---

FV	GL	Quadrados Médios
----	----	------------------

---

		Peroxidase ( $\Delta A_{436 \text{ nm}} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ )	Teor de Fenóis Totais ( $\mu\text{g fenol mg}^{-1} \text{ MS}$ )
Clone (Clo)	3	0,01 **	0,22 **
Subcultivo (Sub)	3	0,001 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
Clo * Sub	9	0,001 *	0,07 *
Resíduo	64	0,0005	0,04
Média Geral	-	437,8	0,8
CV <sub>exp</sub> (%)	-	12,5	21,4

\* e \*\* significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>ns</sup> não-significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste F.

MS = matéria seca e MF = matéria fresca.

Como pode ser visualizado na Figura 26, nos clones CC10 e CC15, que foram os de menor potencial de enraizamento (item 4.1.4.2.), observaram-se certa tendência de diminuição da atividade total de peroxidase com o aumento dos subcultivos e nenhum efeito significativo naqueles clones de maior enraizamento, principalmente o CC12. Isso pode levar à proposição de que a atividade total de peroxidase é mais acentuada em clones menos juvenis, o que concorda com os resultados de HUANG et al. (1996), em *Sequoia sempervirens*, cujo rejuvenescimento estava associado à diminuição do teor de isoenzimas da peroxidase.

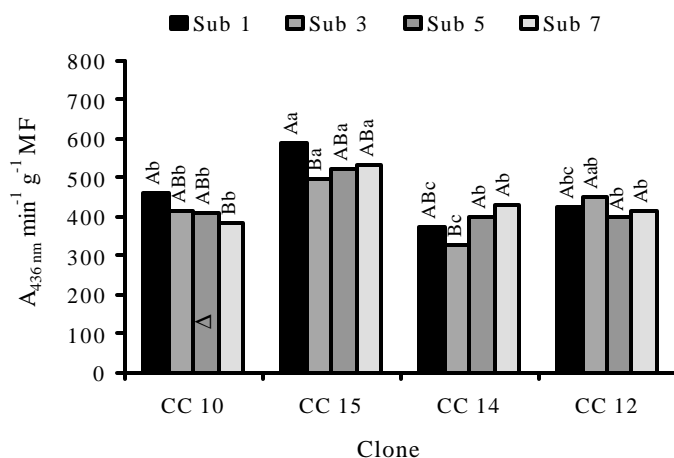


Figura 26– Variação da atividade total da enzima peroxidase por minuto e por grama de matéria fresca de miniestacas, em função dos quatro subcultivos de miniestaquia seriada (Sub) dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos e de uma mesma letra minúscula entre os clones dentro de cada subcultivo não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo SIEGEL (1993), as peroxidases são responsáveis, entre outras coisas, pelo catabolismo de hormônios. Assim, no caso dos clones CC10 e CC15, em que os subcultivos de miniestaquia seriada resultaram em queda na atividade total da enzima peroxidase, pode-se citar que teriam sido responsáveis pelo aumento do conteúdo

interno de promotores de enraizamento, resultando em aumentos nos índices gerais de enraizamento (item 4.1.4.2.). Nos clones CC14 e CC12, em que não se notaram efeitos dos subcultivos na atividade total da enzima peroxidase e na sobrevivência das miniestacas, o teor interno de auxina pode não ser o fator limitante e decisivo do enraizamento.

Para THOMPSON et al. (1987), o processo de envelhecimento das plantas apresenta um padrão geral de aumento da atividade da enzima peroxidase com o aumento da maturidade. Isso reforça a argumentação de que no presente estudo houve rejuvenescimento nos clones CC10 e CC15, uma vez que a miniestaquia seriada resultou em aumento da atividade total da enzima peroxidase e aumento do percentual de sobrevivência das mudas aos 50 dias.

Essas respostas encontradas no presente estudo podem indicar a possibilidade de a atividade total de peroxidase poder vir a ser utilizada como marcador do grau de juvenildade dos propágulos vegetativos de clones de *Eucalyptus grandis*.

Quanto ao teor de fenóis totais (Figura 27), não se observaram diferenças significativas em relação aos subcultivos estudados. Considerando a ocorrência de rejuvenescimento, principalmente do clone CC10, evidenciado pelos índices de enraizamento e sobrevivência dos tratamentos com maior número de subcultivos (itens 4.1.4.2. e 4.3.1.2.), a falta de correlação com o teor de fenóis totais indica não ser este um bom sinalizador do nível de rejuvenescimento. Já em *Prunus domestica* (VIERLING et al., 1992) e *Castanea sativa x Castanea crenata* (MATO et al., 1994), foram encontradas relações, ou seja, maior teor de fenóis em folhas juvenis, em relação às adultas.

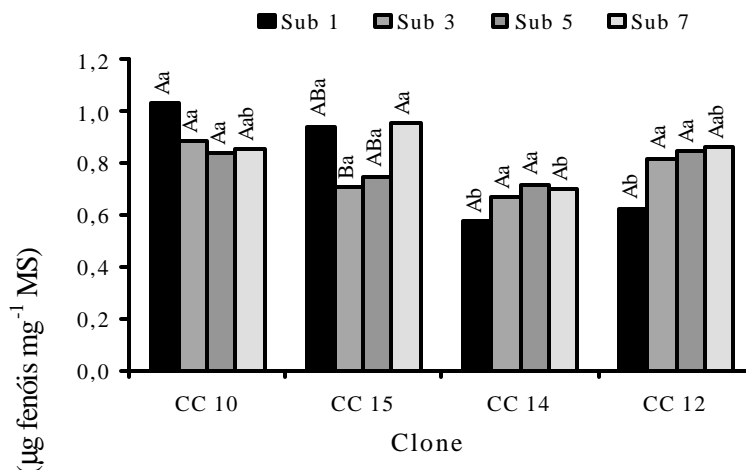


Figura 27– Teor de fenóis totais em miniestacas, em função dos quatro subcultivos de miniestaquia seriada (Sub) dos quatro clones de *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula dentro de cada clone entre os subcultivos e de uma mesma letra minúscula entre os clones dentro de cada subcultivo não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados de pesquisas indicam que, em geral, monofenóis e m-difenóis estimulam a oxidação do AIA, enquanto o-difenóis, p-difenóis e polifenóis inibem essa reação (LEE et al., 1982), bem como uma correlação positiva entre o enraizamento e o teor de fenóis orto-dihidróxi e totais em espécies do gênero *Prunus* (RANA e CHADHA, 1989). Assim, o fato de não se terem encontrado relações entre os subcultivos com o teor de fenóis totais no presente estudo pode estar relacionado à não-distinção na análise entre seus diferentes tipos.

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e nas condições em que foram realizadas as pesquisas, concluiu-se o seguinte:

- A miniestaquia seriada foi mais eficiente no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis* com menor potencial de enraizamento, bem como em condições mais drásticas de vigor das miniestacas, em relação às características de enraizamento, de sobrevivência e de vigor radicular e aéreo.
- Os altos índices de sobrevivência das minicepas indicaram a sustentabilidade do uso do sistema de jardim miniclonal hidropônico em sistema de calhetão, adotado no presente estudo, visando à propagação vegetativa de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia.
- O grau de rejuvenescimento foi variável em razão das características e dos clones avaliados.
- O subcultivo *in vitro* adotado no presente estudo não foi eficiente no rejuvenescimento, uma vez que ambos os clones estudados apresentavam alto potencial de propagação vegetativa, evidenciando a necessidade de serem feitos testes com clones com maiores variações desta característica.
- Maior número de subcultivos pela miniestaquia seriada poderia vir a ser mais eficiente, principalmente, nos dois clones com menor

potencial de enraizamento, podendo resultar em efeitos mais pronunciados no rejuvenescimento.

- Estudos procurando separar os diferentes tipos de fenóis e peroxidases, bem como sua avaliação em diferentes fases de desenvolvimento das brotações, além de outros compostos bioquímicos como indicadores do grau de juvenildade dos propágulos vegetativos, são necessários.
- Em clones com maior dificuldade de enraizamento, são esperados resultados ainda mais eficientes em relação ao rejuvenescimento, permitindo, dessa forma, melhor compreensão da eficiência da ministaquia seriada como método de rejuvenescimento.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, N.; WESTWOOD, M. N. Juvenility as related to chemical content and rooting of stem cuttings of *Pyrus* species. **American Society for Horticultural Science**, v. 93, p. 77-82, 1968.
- ALVARENGA, L. R.; CARVALHO, V. D. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas frutíferas. **Informe Agropecuário**, v. 9, n. 101, p. 47-55, 1983.
- ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 12, n. 141, p. 36-46, 1986.
- ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.
- ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 1, p. 300-304.
- ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONÇALVES, S. I. Propagação por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7, 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria, RS: UFSM, 1992. p. 824-836.
- BAUER, L. M.; JOHNSON, M. E.; WILLIAMS, R. R. Plant genotype, juvenility and mechanisms of inhibition of rooting in *Persoonia virgata* cuttings. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 39, p. 1029-1034, 1999.
- BOLIANI, A. C. **Efeitos do estiolamento basal, da juvenilidade e do uso de um regulador vegetal no enraizamento de estacas de raízes e de ramos herbáceos de algumas espécies frutíferas**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1986. 129 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.

- CAMPINHOS JR., E.; IKEMORI, Y. K. Mass production of *Eucalyptus* spp. by rooting cuttings. In: IUFRO SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON GENETIC IMPROVEMENT AND PRODUCTIVITY OF FAST-GROWING TREE SPECIES, 1980, Águas de São Pedro, São Paulo. **Anais...** [S.l.]: IUFRO, [198-]. p. 2-17.
- CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais.** Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995. 451 p.
- CHALFUN, N. N. J. **Fatores bioquímicos e fisiológicos no enraizamento de estacas de *Hibiscus rosa-sinensis*** L. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1989. 85 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CHAPERON, H. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPÉCIES FORESTALES, 1987, Buenos Aires, Argentina. **Anales...** [S.l.]: AFOCEL, [19--]. p. 215-232, 1987.
- CHRISTENSEN, J. H.; BAUW, G.; WELINDER, K. G.; MONTAGU, M. V.; BOERJAN, W. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. **Plant Physiology**, n. 118, p. 125-135, 1998.
- CLAIR, J. B. ST.; KLEINSCHMIT, J.; SVOLBA, J. Juvenility and serial vegetative propagation in Norway spruce clones (*Picea abies*). **Silvae Genetica**, v. 34, n. 1, p. 422-448, 1985.
- COMÉRIO, J.; XAVIER, A.; IANELLI, C. M. Microestaquia: um novo sistema de produção de mudas de *Eucalyptus* na Champion. In: ENCONTRO TÉCNICO FLORESTAL, 7, 1996, Belo Horizonte. **Anais...** Piracicaba, SP: ABRACAVE, 1996. 6 p.
- CUQUEL, F. L. **Enraizamento de estacas de crisântemo *Dendrathera morifolium* tratadas com ácido indolbutírico.** Piracicaba, SP: ESALQ, 1992. 66 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation technology and application.** The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 486.
- DRUART, P. H.; KEVERS, C. L.; BOXUS, P. H.; GASPAR, T. H. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. **Z. Pflanzenphysiologie Bd.**, n. 108, p. 429-436, 1982.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; Van WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding.** Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228-246.
- FACHINELLO, J. C. **Efeitos morfofisiológicos do anelamento no enraizamento de estacas lenhosas de macieira cultivar malling-merton 106.** Piracicaba, SP:

- ESALQ, 1986. 93 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- FRANCLLET, A.; BOULAY, M.; BEKKAOUI, F.; FOURET, Y.; VERSCHOORE-MARTOUZET, B.; WALKER, N. Rejuvenation. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987. v.1, p.232-248.
- GARCIA, J. L. et al. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. **Scientia Horticulturae**, n. 85, p. 271-284, 2000.
- GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILO, F. J.; GREPPIN, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Plant Physiology**, n. 64, p. 418-423, 1982.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture - the technology**. [S.l.]: Exegetics, England, 1993. v. 1, 574 p.
- GESTO, M. D. V.; VÁZQUEZ, A.; VIEITEZ, E. Rooting substances in water extracts of *Castanea sativa* and *Salix viminalis*. **Physiologia Plantarum**, n. 40, p. 265-268, 1977.
- GOMES, A. L. **Propagação clonal: princípios e particularidades**. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69 p. (Série Didáctica, Ciências Aplicadas, 1).
- GOMES, J. M. **Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*, produzidas em diferentes tamanhos de tubete e de dosagem de N-P-K**. Viçosa, MG: UFV, DGU, 2001. 166 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Departamento de Engenharia Florestal - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- GONÇALVES, A. N. **Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*. S. T. *in vitro***. Piracicaba, SP: ESALQ, 1982. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- GREENWOOD, M. S. Theoretical aspects of juvenility and maturation. In: DAVIES, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species**. Bordeaux: [s.n.], 1992. (Colloque AFOCEL IUFRO, Paris, 1992).
- GREENWOOD, M. S.; HUTCHISON, K. W. Maturation as an developmental process. In: AHUJA, M. R.; LIBBY, W. J. **Clonal forestry: genetics and biotechnology**. Budapest: Springer-Verlag, 1993. p. 14 - 33.
- GUERREIRO, C. A.; COLLI JUNIOR, G. Controle de qualidade de mudas de *Eucalyptus* spp. Na Champion Papel e Celulose S.A. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES E MUDAS FLORESTAIS. **Anais...** Curitiba, PR: FUPEF, 1984. p. 164-170.

- HACKETT, W. P. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIES, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1987a. p. 11 - 28. (Advances in Plant Sciences Series, 2).
- HACKETT, W. P. Juvenility and maturity. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Keuwer Academic Publishers, 1987b. v.1, p.216-231.
- HACKETT, W. P.; MURRAY, J. R. Maturation and rejuvenation in woody species. In: AHUJA, M. R. **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 93 - 105.
- HAISSIG, B. E. Influences of auxins and auxins synergists on adventitious root primordium initiation and development. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 4, p. 311-323, 1974.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.
- HENRY, P. H.; BLAZICH, F. A.; HINESLEY, L. E. Nitrogen nutrition of containerized eastern redcedar. II. Influence of stock plant fertility on adventitious rooting of stem cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 4, n. 117, p. 568-570, 1992 (CD-ROM. Abstract).
- HUANG, H. J. et al. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens in vitro*: changes in isoesterases and isoperoxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 37, n. 1, p. 77-80, 1996. (CD-ROM. Abstract).
- HUANG, L. C. et al. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 252 - 264.
- IKEMORI, Y. K. **Resultados preliminares sobre enraizamento de estacas de *Eucalyptus* spp.** [S.l.: s.n.], 1975. p. 12 (Informativo Técnico Aracruz, 1).
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Enciclopédia dos municípios brasileiros**. Rio de Janeiro, RJ, IBGE, 1969. v. 27, 459 p.
- IRITANI, C.; SOARES, R. V. Indução do enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia* através da aplicação de reguladores de crescimento. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4, 1982, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBS, 1983. p. 313-317.
- JAEGER, G. de.; BOYER, N.; GASPAR, Th. Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: changes in soluble and wall peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase activity, cellulose, lignin content and monomeric constituents. **Plant Growth Regulation**, v. 3, p. 133-148, 1985.

- JAY-ALLEMAND, C. et al. Juvenility and physiology of rhizogenesis in two woody species (*Sequoia sempervirens* and *Juglans nigra* x *Juglans regia*). In: **Eurosilva** contribution to forest tree physiology. Dourdan, France: Eurosilva Research Programme, 1995. n. 76, p. 79-99. (CD-ROM. Abstract).
- KAO, Y. P.; HUANG, S. G. Cuttings propagation of *Cinnamomum kanehirae*. **Bulletin of the Taiwan Forestry Research Institute**, v. 53, n. 8, p. 371-388, 1993. (CD-ROM. Abstract).
- KEFELI, V. I.; KADYROV, C. Sh. Natural growth inhibitors, their chemical and physiological properties. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 57, p. 185-196, 1971.
- KIM, Y. M.; KWON, H. M.; MIN, Y. Y. Grafting propagation for promoting rejuvenity in *Quercus* species. **Forest Genetics Research Institute**, v. 0, n. 29, p. 113-120, 1993. (CD-ROM. Abstract).
- LAND, S. B.; ELAM, W. W.; MOHAMMAD, K. Rejuvenated sycamore cuttings for energy plantations. In: Biomass-and-Bioenergy, 1995, Department of Forestry. **Journal article...** v. 8, n. 4, p. 255-264, 1995.
- LEE, T. T.; STARRATT, A. N.; JEVNIKAR, J. J. Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: structure-activity relationships. **Phytochemistry**, v. 21, p. 517-523, 1982.
- MATO, M. C.; MENDEZ, J.; VAZQUEZ, A. Polyphenolic auxin protectors in buds of juvenile and adult chestnut. **Physiologia Plantarum**, v. 1, n. 91, p. 23-26, 1994. (CD-ROM. Abstract).
- MENZIES, M. I. Management of stock plants for the production of cutting material. In: SYMPOSIUM IN IUFRO'S CENTENNIAL YEAR - MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, 1992, Bordeaux. **Syntheses...** Paris: AFOCEL, IUFRO, 1992. p. 145-158. (Colloque AFOCEL - IUFRO).
- MODAK, S. B.; HATI, A. P.; BISWAS, N.; BASU, P. K. Effect of exogenously applied sucrose on rooting of *Adhatoda vasica* Nees shoot cuttings. **Indian Journal of Forestry**, v. 13, n. 1, p. 43-45, 1990.
- MOE, R. Stock plant environmental and subsequent adventitious rooting. In: DAVIES, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1987. p. 214 - 234. (Advances in Plant Sciences Series, 2).
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.437-497, 1962.
- OERTLI, J. J. Exogenous application of vitamins as regulators for growth and development of plants – a review. **Pflanzenernähr**, n. 150, p. 375-391, 1987.

- OKORO, O. O.; GRACE, J. The physiology of rooting *Populus* cuttings I. carbohydrates and photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, n. 36, p. 133-138, 1976.
- ORTIZ, C. E. R. **Comportamento de alguns parâmetros bioquímicos durante o enraizamento *in vitro* de *Sequoia sempervirens***. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1992. 73 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- PARKER, S. R.; WHITE, T. L.; HODGE, G. R.; POWELL, G. L. The effects of scion maturation on growth and reproduction of grafted slash pine. **New Forest**, v. 3, n. 15, p. 243-259, 1998.
- RANA, H. S.; CHADHA, T. R. Studies on the clonal propagation of *Prunus* species and their relationship with some biochemical characters. **Progressive Horticulture**, v. 21, n. 3-4, p. 329-335, 1989. (CD-ROM. Abstract).
- REY, M.; DÍAZ-SALA, C.; RODRÍGUEZ, R. Effect of repeated severe pruning on endogenous polyamine content in hazelnut trees. **Physiologia Plantarum**, n. 92, p. 487-492, 1994.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, F. B. **Plant physiology**. 2nd. ed. California: Wadsworth Publishing Company, 1978. 422 p.
- SCHMIDT, D. V. C. **Crescimento de mudas de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus grandis* em resposta à fertilização potássica e à calagem**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1995. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SCHNECK, V. Untersuchungen zur klonabhängigkeit der bewurzelungsfähigkeit und der qualität der wurzelbildung bei der stecklingsvermehrung von 40 - bis 350 jährigen auslesebäumen der Eibe (*Taxus baccata*). **Silvae Genetica**, v. 45, n. 5-6, p. 246-249, 1996.
- SIEGEL, B. Z. Plant preoxidases - an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, n. 12, p. 303-312, 1993.
- SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analyses of phenolic constituents. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, p. 63-68, 1959.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991. 559 p.
- THOMPSON, D. G. Current state-of-the-art of rooting cuttings and a view to the future. In: SYMPOSIUM IN IUFRO'S CENTENNIAL YEAR – MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, 1992, Bordeaux. **Syntheses...** Paris: AFOCEL, IUFRO, 1992. p. 159-172. (Colloque AFOCEL – IUFRO).

- THOMPSON, J. E.; LEGGE, R. L.; BARBER, R. F. The role of free radicals in senescence and wounding. **New Phytologist**, n. 105, p. 317-344, 1987.
- TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. Viçosa, MG: UFV, DGU, 2001, 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- VAN STADEN, J.; HARTY, A. R. Cytokinins and adventitious root formation. In: DAVIES, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1987. p. 185 - 201. (Advances in Plant Sciences Series, 2).
- VAZQUEZ, A.; GESTO, D. V. Juvenility and endogenous rooting substances in *Castanea sativa*. **Biologia Plantarum**, n. 24, v. 1, p. 48-52, 1982.
- VIERLING, B.; HARTMANN, W.; STOSSER, R. Phenolic substances in leaves of damsons (*Prunus domestica*) in relation to juvenility. **Angewandte Botanik**, n. 66, v. 1, p.7-13, 1992. (CD-ROM. Abstract).
- VON ADERKAS, P.; BONGA, J. M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology**, n. 20, p. 921-928, 2000.
- WELANDER, M. Influence of environment, fertilizer and genotype on shoot morphology and subsequent rooting of birch cuttings. **Tree Physiology**, n. 15, v. 1, p. 11-18, 1995.
- WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1999, 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J. M.; PIRES, I. E.; ANDRADE, H. B. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 24, n. 2, p. 181-186, 2000a.
- WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J. M.; PIRES, I. E.; ANDRADE, H. B. Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 24, n. 2, p. 187-192, 2000b.
- WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v.30, p.33-36, 1943.
- XAVIER, A.; ANDRADE, H. B.; OLIVEIRA, M. L.; WENDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de híbrido de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas *in vitro*. **Scientia Forestales**, n. 51, p. 29-36, 1997.

- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.20, n.1, p.9-16, 1996.
- XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa, MG: SIF, 1998. 10 p (Informativo Técnico SIF, 11).
- ZANOL, G. C. **Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto Marabakaido (*Malus prunifolia*) influenciado pela exposição de períodos de escuro, concentrações de ácido indolbutírico e floroglucinol**. Pelotas, RS: FAEM, 1996. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas.
- ZANOL, G. C.; FORTES, G. R. L.; CAMPOS, A. D.; SILVA, J. B.; CENTELLAS, A. Q. Enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' tratado com ácido indolbutírico e floroglucinol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n 10, v. 1, p. 65-68, 1998.
- ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: North Carolina State University, 1984. 505 p.



## APÉNDICE

## APÊNDICE A

Quadro 1A – Temperaturas do ar mínimas, máximas e médias semanais de abril a julho de 2001, na área experimental

		Temperaturas do Ar (°C)											
		Abril			Maio			Junho			Julho		
		Min	Máx	Méd	Min	Máx	Méd	Min	Máx	Méd	Min	Máx	Méd
Semana	1	18,9	35,5	27,2	8,8	34,3	20,4	19,3	30,1	23,6	11,0	28,2	17,8
	2	19,4	37,9	26,2	14,0	32,5	22,0	10,6	28,7	21,3	13,1	28,1	19,3
	3	17,3	34,8	24,6	9,2	31,7	19,8	14,3	28,7	18,4	12,3	28,2	18,9
	4	18,3	34,6	26,0	13,2	28,6	21,2	15,2	31,0	22,0	16,7	30,0	21,9
	5	17,4	33,6	24,5	18,3	32,5	23,6	14,1	28,9	20,0	15,2	27,3	20,0
	Méd	18,3	35,3	25,7	12,7	31,9	21,4	14,7	29,5	21,1	13,7	28,4	19,6

Min = temperatura mínima, Máx = temperatura máxima e Méd = média.

Fonte: Estação Climática Rio Doce - CENIBRA.

Quadro 2A – Umidade relativa do ar média semanal de abril a julho de 2001, na área experimental

		Umidade Relativa do Ar (%)			
		Abril	Maio	Junho	Julho
Semana	1	69,9	59,0	75,6	81,5
	2	74,7	73,8	84,0	80,2
	3	76,4	68,1	85,2	81,1
	4	70,5	80,3	79,4	80,8
	5	71,4	82,5	80,2	80,7
	Média	72,6	72,7	80,9	80,9

Fonte: Estação Climática Rio Doce - CENIBRA.

Quadro 3A – Radiação total (W/m<sup>2</sup>) média semanal de abril a julho de 2001, na área experimental

		Radiação Total (W/m <sup>2</sup> )			
		Abril	Maio	Junho	Julho
Semana	1	236,8	150,4	155,2	163,4
	2	207,5	201,2	126,1	140,5
	3	239,5	195,3	206,3	149,9
	4	206,5	155,4	139,4	140,4
	5	194,3	141,8	147,1	155,6
	Média	216,9	168,8	154,8	150,0

Fonte: Estação Climática Rio Doce - CENIBRA.

