

Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de
Eucalyptus urophylla x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*Rooting of mini-cuttings and micro-cuttings of
Eucalyptus urophylla x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*Leandro Silva de Oliveira¹, Aloisio Xavier², Poliana Coqueiro Dias³,
Anne Caroline Guieiro Correia⁴, Silvano Rodrigues Borges⁵,
Elizabete Keiko Takahashi⁶ e Haroldo Nogueira de Paiva²

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do ácido indol-3-butírico (AIB) no enraizamento de miniestacas e microestacas apicais e intermediárias, bem como a velocidade de enraizamento em casa de vegetação de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. As avaliações do efeito da aplicação de AIB foram realizadas nas saídas da casa de vegetação (30 dias), casa de sombra (40 dias) e na fase de crescimento a pleno sol aos 60 dias após o estaqueamento. A avaliação da velocidade de enraizamento foi realizada no decorrer de 35 dias de permanência dos propágulos na casa de vegetação. O AIB não apresentou efeito significativo sobre a sobrevivência, enraizamento e vigor das miniestacas e microestacas. Os propágulos apicais foram superiores em relação aos intermediários, com maior predisposição ao enraizamento. A velocidade de enraizamento das microestacas e miniestacas foi variável entre os clones. Os resultados indicaram que o enraizamento das microestacas em relação às miniestacas foi diferenciado entre os clones, não havendo superioridade expressiva da microestaquia comparativamente à miniestaquia para as características avaliadas. No entanto, constatou-se maior velocidade de enraizamento das microestacas, o que indica maior vigor das microestacas em relação às miniestacas.

Palavras-chave: Microestaquia, miniestaquia, regulador de crescimento, tipo de propágulo.

Abstract

The objective of the present work was to evaluate the effect of indol-3-butyric acid (IBA) on the rooting of mini-cuttings and micro-cuttings (apical and intermediate stems), as well as the speed of rooting in the greenhouse of two clones of *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and two of *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. The evaluation of the effect of AIB was done at the time of leaving the greenhouse (30 days) and shade house (40 days) and also in the phase of growth in full sun condition at 60 days. The evaluation of rooting speed was carried out during the 35 days of permanence of mini-cuttings and micro-cuttings in the greenhouse. The IBA had no special effect on the survival, rooting and vigor of the mini-cuttings and micro-cuttings. The apical cuttings were more prone to rooting when compared to the intermediate ones. The speed of rooting of mini-cuttings and micro-cuttings was variable among clones. The micro-cutting technique was superior to the mini-cutting only for certain parameters evaluated for each clone. However, micro-cuttings rooted faster than mini-cuttings suggesting greater micro-cuttings vigor, as compared to the mini-cuttings.

Keywords: Micro-cutting technique, mini-cutting technique, growth regulator; ramet type.

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais. ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP - 13418-900. - E-mail: leandroliveira@usp.br

²Professor Doutor do Departamento de Engenharia Florestal. UFV - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - 36571-000. E-mail: xavier@ufv.br; hnpaiva@ufv.br

³Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal. UFV - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - 36571-000. E-mail: policoqueiro@yahoo.com.br

⁴Mestre em Ciência Florestal. UFV - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - 36571-000. E-mail: aguieirocorreia@yahoo.com.br

⁵Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. UFV - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - 36570-000. E-mail: borgesilvano@yahoo.com.br

⁶Pesquisadora Doutora. Celulose Nipo-Brasileira S.A., CENIBRA, Belo Oriente, MG - Caixa Postal 100, 35196-972. E-mail: elizabete.takahashi@cenibra.com.br

INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus globulus* apresenta características tecnológicas da madeira, como maior rendimento em celulose e menor teor de lignina, que o torna muito atrativo para fins de produção de celulose e papel. O interesse crescente pelo *Eucalyptus globulus* e seus híbridos tem incentivado pesquisas na área de clonagem, visando contornar problemas relacionados à recalcitrância ao enraizamento, em razão de baixos percentuais de enraizamento e a formação de um sistema radicular de baixa qualidade (BENNET *et al.*, 1994; BORGES *et al.*, 2011; CALDERÓN-BALTIERRA *et al.*, 2004).

A miniestaquia constitui-se na principal técnica de propagação clonal de *Eucalyptus*, utilizada pelas empresas do setor florestal, a qual, muitas vezes, apresenta resultados tão eficientes quanto os da microestaquia para produção de mudas clonais (WENDLING *et al.*, 2000). No entanto, o *Eucalyptus globulus*, e seus híbridos, têm apresentado restrições na propagação vegetativa pela miniestaquia, em razão da variabilidade da habilidade rizogênica dos clones, bem como pela redução do potencial de enraizamento com o envelhecimento das plantas matrizes (WATT *et al.*, 2003).

Dessa forma, o rejuvenescimento promovido pela micropropagação tem sido relatado como eficiente para “reverter”, ainda que parcialmente, o envelhecimento ontogenético observado em *Eucalyptus*, principalmente em relação àqueles clones com maiores dificuldades de enraizamento (XAVIER *et al.*, 2009). Assim, rejuvenescimento clonal de *Eucalyptus* pela micropropagação tem sido empregado de forma mais direta na propagação pela microestaquia (TITON, 2005).

A técnica de microestaquia para clones de *Eucalyptus urophylla*, e seus híbridos com *Eucalyptus grandis*, possibilitou consideráveis ganhos, principalmente quanto ao aumento dos percentuais e qualidade de enraizamento adventício, bem como na redução do tempo para a formação da muda clonal (XAVIER; COMÉRIO, 1996). Portanto, no caso específico de espécies e híbridos considerados recalcitrantes como o *Eucalyptus globulus*, estudos sobre a velocidade de enraizamento permitem comparar o desempenho das miniestacas e microestacas e consequentemente comprovar a viabilidade da utilização da técnica de microestaquia para esses materiais genéticos em questão.

Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a eficiência do regulador de crescimento AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas apicais e intermediárias, bem como a velo-

cidade de enraizamento em casa de vegetação de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material experimental

O material genético utilizado nesse estudo foi constituído por dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26 e C30), resultado do programa de melhoramento genético da empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), localizada no município de Belo Oriente, Minas Gerais. Os cruzamentos foram realizados utilizando poléns de *Eucalyptus globulus*, provenientes do Instituto Raiz em Portugal, e como genitores femininos, matrizes superiores de *Eucalyptus grandis* ou *Eucalyptus urophylla* da própria empresa.

A produção de mudas micropropagadas, para a obtenção do material experimental da microestaquia, foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) enquanto o experimento de enraizamento adventício das miniestacas e microestacas foi realizado no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Formação do minijardim e microjardim clonal

Conforme as técnicas de miniestaquia e microestaquia, descritas por Xavier *et al.* (2009), o jardim clonal foi constituído de minicepas e microcepas plantadas sob um mesmo sistema semi-hidropônico de canaletão de areia, em casa de vegetação com as laterais abertas, sendo a cobertura de plástico transparente de polietileno.

As microcepas foram obtidas a partir de microestacas enraizadas provenientes de material micropropagado, através da proliferação de gemas axilares. O número de subcultivos *in vitro* realizados para os clones C04, C16, C26 e C30 foram de 15, 18, 14 e 14 respectivamente, sendo cada subcultivo realizado a cada 30 dias. Por outro lado, as minicepas foram formadas de miniestacas enraizadas de plantas propagadas pelo método da miniestaquia.

As miniestacas e microestacas enraizadas foram transplantadas para o jardim clonal, no espaçamento de 10 x 10 cm e ao atingirem cerca de 10 cm de tamanho tiveram seus ápices podados para a formação das minicepas e micro-

cepas. O sistema de manejo e nutrição adotados foi idêntico para as minicepas e microcepas sendo, portanto, seguido o mesmo padrão de condução para ambos.

O sistema de fertirrigação adotado consistiu no fornecimento às plantas de solução nutritiva por gotejamento, distribuída quatro vezes ao dia, numa vazão total diária de 4 L m⁻². A solução nutritiva foi composta de nitrato de cálcio (0,920 g L⁻¹), cloreto de potássio (0,240 g L⁻¹), nitrato de potássio (0,140 g L⁻¹), monoamônio fosfato (0,096 g L⁻¹), sulfato de magnésio (0,364 g L⁻¹), hidróferro (0,040 g L⁻¹), ácido bórico (2,800 mg L⁻¹), sulfato de zinco (0,480 mg L⁻¹), sulfato de manganês (1,120 mg L⁻¹), sulfato de cobre (0,100 mg L⁻¹) e molibdato de sódio (0,040 mg L⁻¹). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em 2,0 mS m⁻² a 25 °C.

Obtenção e enraizamento de miniestacas e microestacas

Miniestacas e microestacas apicais e intermediárias foram coletadas no minijardim e microjardim clonal e acondicionadas em caixas de isopor contendo água, visando manter as condições de vigor e turgescência do material vegetativo. As miniestacas e microestacas apicais foram preparadas com tamanho de 10 cm contendo de dois a três pares de folhas, enquanto as intermediárias medindo 5 cm com um par de folhas, reduzidas à metade de sua dimensão original. As miniestacas e microestacas denominadas intermediárias foram obtidas da porção intermediária do ramo que deu origem a miniestaca ou microestaca apical.

No enraizamento de miniestacas ou microestacas, utilizaram-se como recipientes tubetes plásticos de 55 cm³ de capacidade, contendo o substrato comercial MecPlant®. A nutrição mineral de base utilizada no substrato foi composta de superfosfato simples (8,00 kg m⁻³), sulfato de amônio (0,69 kg m⁻³), cloreto de potássio (0,21 kg m⁻³), sulfato de zinco (13,9 g m⁻³), sulfato de cobre (13,9 g m⁻³), sulfato de manganês (13,9 g m⁻³) e ácido bórico (27,8 g m⁻³).

Efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas

As miniestacas ou microestacas apicais e intermediárias foram tratadas com o regulador de crescimento AIB (Sigma Co.) nas concentrações de 0 e 2000 mg L⁻¹, na formulação líquida, dissolvido em hidróxido de potássio (KOH) a 1 mol L⁻¹ e diluídos em água deionizada. As miniestacas ou microestacas tiveram suas bases (1

cm) mergulhadas na solução de AIB por um período de 10 segundos, antes de serem inseridas no substrato. O período compreendido entre a coleta das miniestacas ou microestacas e a sua inserção no substrato, na casa de vegetação, foi sempre inferior a 30 minutos.

As microestacas e miniestacas permaneceram em casa de vegetação climatizada (umidade relativa do ar ≥ 80% e temperatura entre 20 e 30 °C) com permanência de 30 dias, e, posteriormente, foram transferidas para casa de sombra (permanência de 10 dias para aclimatação) e, finalmente, a pleno sol até completarem 60 dias de idade. Realizou-se adubação de cobertura aplicando-se 2 mL por muda de fosfato monoamônico (2,0 g L⁻¹), na saída de casa de vegetação. Na saída da casa de sombra aplicou-se 5 mL por muda do formulado NPK (10-05-30) (6 g L⁻¹).

As características avaliadas na saída da casa de vegetação (30 dias) e da casa de sombra (40 dias) foram a porcentagem de sobrevivência e de miniestacas e microestacas com raiz observada na extremidade inferior do tubete. Após 60 dias avaliou-se novamente as porcentagens de sobrevivência, de miniestacas e microestacas com raiz observada na extremidade inferior do tubete, e também o número de raízes por miniestaca ou microestaca enraizada, o diâmetro do colo, a altura e a biomassa seca da parte aérea e das raízes das miniestacas e microestacas. A biomassa da parte aérea e das raízes foi determinada após a secagem do material vegetal, até atingir peso constante, em estufa a 70 °C.

Para efeito das avaliações, foram consideradas enraizadas e vivas as miniestacas e microestacas com raízes maiores ou iguais a 0,5 cm e com emissão de brotações e; para a contagem do número de raízes, foram consideradas as raízes emitidas diretamente da base das miniestacas ou microestacas.

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos ao acaso, em arranjo fatorial (2 x 2 x 2 x 4), constituído de dois tipos de miniestacas e microestacas (apicais e intermediárias), duas doses de AIB (0 e 2000 mg L⁻¹), duas técnicas de propagação vegetativa (miniestaquia e microestaquia) e quatro clones (C04, C16, C26 e C30), com quatro repetições, compostas por 8 miniestacas ou microestacas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa computacional Statistica 7 (Statsoft, Inc).

Velocidade de enraizamento de miniestacas e microestacas

As avaliações de velocidade de enraizamento das miniestacas e microestacas foram feitas, a cada 7 dias, a partir da data de estaqueamento até o 35º dia, sendo que durante todo este período os propágulos permaneceram em casa de vegetação.

Conforme metodologia definida por Melo (2009), nas datas de avaliação foi quantificada: a porcentagem de miniestacas e microestacas com algum grau de modificação (presença de pontos translúcidos, intumescimento da base do propágulo, formação de calo e pontos de iniciação de raízes), a porcentagem de miniestacas e microestacas enraizadas (raízes maiores ou iguais a 0,5 cm) e a porcentagem de miniestacas e microestacas com raízes maiores que 10 cm de comprimento (estacas com raízes observadas na extremidade inferior do tubete).

O experimento foi conduzido no delineamento estatístico de blocos ao acaso, em arranjo fatorial (2 x 4), constituído de duas técnicas de propagação vegetativa (minietaquia e microetaquia) e quatro clones (C04, C16, C26 e C30), sendo cada bloco constituído por quatro repetições compostas por 8 miniestacas ou microestacas. Em cada mensuração foram avaliadas quatro repetições por clone.

Adicionalmente foi realizada a avaliação qualitativa do comportamento das miniestacas e microestacas de cada clone durante o período em estudo. Nesta avaliação, foram avaliadas características como a presença de reações de oxidação na base, formação de calos e tombamento de miniestacas e microestacas.

Os dados obtidos referentes à porcentagem de miniestacas e microestacas com algum grau de modificação, porcentagem de miniestacas e microestacas enraizadas e porcentagem de miniestacas e microestacas com raízes maiores que 10 cm foram utilizados para o ajuste da melhor função que representasse a distribuição dos dados. As equações foram obtidas através do programa CurveExpert 1.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas

Os clones apresentaram percentuais de sobrevivência superiores a 71,9% na saída casa de vegetação, sendo observado um único valor de 65,6% para o clone 16. Por outro lado, o clone 30 apresentou diferenças entre tratamentos com

AIB (Tabela 1). Os resultados foram superiores aos encontrados em miniestacas de *Eucalyptus globulus* x *E. maidenii* (PAIM *et al.*, 2005).

A sobrevivência na saída da casa de sombra das miniestacas e microestacas reduziu comparativamente à saída de casa de vegetação, contudo, não existiu diferença entre os tratamentos (tipo de estaca e AIB) para os clones (Tabela 1). As variações ambientais relativas à umidade, luminosidade na casa de sombra durante a aclimação podem ter sido as responsáveis pelo estresse nas estacas o que acarretou a mortalidade dessas (BRONDANI *et al.*, 2010a; BRONDANI *et al.*, 2010b ; WENDLING; XAVIER, 2005a).

Com relação à constatação da saída de raízes na extremidade inferior do tubete para a saída da casa de vegetação, as estacas apicais foram superiores às intermediárias apenas para o clone C04, enquanto na saída da casa de sombra, esse resultado foi semelhante para os clones C04 e C26. Além disso, as estacas do clone C04 tratadas com 2000 mg L⁻¹ de AIB foram superiores àquelas que não receberam a aplicação de AIB na saída da casa de sombra (Tabela 1).

O crescimento a pleno sol é a etapa final de formação da muda, na qual as mudas apresentam um sistema radicular desenvolvido, ocorrendo a degeneração daquelas estacas com um sistema radicular incompleto. Dessa forma, a redução no enraizamento observada para as miniestacas e microestacas, quando transferidas para a fase de crescimento em pleno sol, indicou que muitos propágulos ainda não possuíam sistema radicular adequado que assegurasse o desenvolvimento da muda (Tabela 2).

Os percentuais de enraizamento das miniestacas e microestacas apicais do clone 04 foram superiores aos das intermediárias. As estacas apicais, em geral, apresentaram maior predisposição ao enraizamento, em comparação às intermediárias, devido ao menor grau de maturação fisiológica e lignificação de seus tecidos, sendo mais responsivas à formação de raízes adventícias (XAVIER *et al.*, 2009). Acrescenta-se que as auxinas são sintetizadas principalmente em regiões de crescimento ativo, como gemas terminais e primórdios foliares, justificando os níveis endógenos mais elevados nas estacas apicais, favorecendo o enraizamento (BORGES *et al.*, 2011). Os resultados refletiram também em maior crescimento do diâmetro do colo das estacas apicais em relação às intermediárias do clone C04 e para a altura das microestacas dos clones C16, C26 e C30 (Tabela 2).

Tabela 1. Sobrevivência (SOB) e raízes observadas no fundo do tubete (RFT) de miniestacas (Mini) e microestacas (Micro) apicais (AP) e intermediárias (INT), na saída da casa de vegetação (30 dias) e da casa de sombra (40 dias) dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26 e C30), em função do tratamento com AIB (0 e 2000 mg L⁻¹).

Tabela 1. Survival (SOB) and roots observed in the bottom of container (RFT) of apical, intermediate mini-cuttings (Mini) and micro-cuttings (Micro) at the time of greenhouse leaving (30 days) and shade house leaving (40 days) of the four *Eucalyptus globulus* hybrid clones (C04, C16, C26 e C30), depending on treatment with growth regulator IBA (0 e 2000 mg L⁻¹).

Clone	Técnica	Tipo	AIB	Casa de vegetação		Casa de sombra	
				SOB (%)	RFT (%)	SOB (%)	RFT (%)
C04	Mini	AP	0	93,8 Aa	12,5 Aa	84,4 Aa	28,1 Ab
			2000	87,5 Aa	31,3 Aa	87,5 Aa	62,5 Aa
		INT	0	93,8 Aa	9,38 Ba	81,3 Aa	18,8 Bb
			2000	90,6 Aa	0,00 Ba	78,1 Aa	28,8 Ba
	Micro	AP	0	84,4 Aa	21,9 Aa	78,1 Aa	40,6 Ab
			2000	84,4 Aa	43,8 Aa	84,4 Aa	59,4 Aa
		INT	0	84,4 Aa	12,5 Ba	78,1 Aa	18,8 Bb
			2000	96,9 Aa	12,5 Ba	81,3 Aa	37,5 Ba
C16	Mini	AP	0	87,5 Aa	25,0 Aa	68,8 Aa	34,4 Aa
			2000	71,9 Aa	21,9 Aa	71,9 Aa	43,8 Aa
		INT	0	93,8 Aa	28,1 Aa	75,0 Aa	37,5 Aa
			2000	75,0 Aa	18,8 Aa	56,3 Aa	37,5 Aa
	Micro	AP	0	78,1 Aa	37,5 Aa	71,9 Aa	53,1 Aa
			2000	93,8 Aa	34,4 Aa	62,5 Aa	53,1 Aa
		INT	0	93,8 Aa	34,4 Aa	93,8 Aa	46,9 Aa
			2000	65,6 Aa	31,3 Aa	65,6 Aa	43,8 Aa
C26	Mini	AP	0	87,5 Aa	9,38 Aa	81,3 Aa	62,5 Aa
			2000	93,8 Aa	25,0 Aa	93,8 Aa	40,6 Aa
		INT	0	90,6 Aa	18,8 Aa	71,9 Aa	31,3 Ba
			2000	93,8 Aa	6,25 Aa	78,1 Aa	25,0 Ba
	Micro	AP	0	84,4 Aa	25,0 Aa	84,4 Aa	62,5 Aa
			2000	84,4 Aa	25,0 Aa	78,1 Aa	81,3 Aa
		INT	0	90,6 Aa	15,6 Aa	87,5 Aa	37,5 Ba
			2000	90,6 Aa	12,5 Aa	78,1 Aa	31,3 Ba
C30	Mini	AP	0	87,5 Aa	6,25 Aa	81,3 Aa	34,4 Aa
			2000	65,6 Ab	15,6 Aa	62,5 Aa	34,4 Aa
		INT	0	87,5 Aa	6,25 Aa	71,9 Aa	31,3 Aa
			2000	78,1 Ab	3,13 Aa	78,1 Aa	18,8 Aa
	Micro	AP	0	90,6 Aa	21,9 Aa	84,4 Aa	43,8 Aa
			2000	78,1 Ab	21,9 Aa	78,1 Aa	34,4 Aa
		INT	0	87,5 Aa	25,0 Aa	87,5 Aa	46,9 Aa
			2000	78,1 Ab	9,38 Aa	78,1 Aa	31,3 Aa

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, entre tratamentos com AIB e dentro de um mesmo tipo de propágulo, e as seguidas de uma mesma letra maiúscula, entre tipos de propágulos dentro do mesmo tratamento com AIB, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Por outro lado, o enraizamento das microestacas dos clones C16 e C30 foi superior ao das miniestacas (Tabela 2). A ausência de diferença entre miniestaquia e microestaquia para os clones C04 e C26 pode ter sido em razão do grau de juvenildade e vigor vegetativo apresentado pelas minicepas utilizadas, refletido diretamente no enraizamento.

Entretanto, é possível que o número de subcultivos, na fase de multiplicação *in vitro* dos clones C04 e C16, não tenha sido suficiente para promover rejuvenescimento significativo dos materiais genéticos. De acordo com Xavier *et al.* (2009), resultados satisfatórios para o enraizamento via microestaquia de *Eucalyptus* tem sido

obtidos após 10 e 12 subcultivos pela micropropagação para clones de *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus grandis* e seus híbridos. Entretanto, flutuações na capacidade rizogênica são capazes de ocorrer mesmo entre genótipos estritamente aparentados de acordo com um determinismo endógeno (MANKESSI *et al.*, 2009), podendo não refletir de maneira idêntica o rejuvenescimento promovido pela micropropagação.

As miniestacas e microestacas apicais dos clones C04 e C26 diferiram das intermediárias quanto à porcentagem de raízes observadas na extremidade inferior do tubete na área de pleno sol, enquanto diferença da microestaquia em relação à miniestaquia para essa característica

Tabela 2. Enraizamento (ENR), raízes observadas na extremidade inferior do tubete (RFT), número de raízes (NR), diâmetro de colo (DC), altura (ALT) e biomassa da parte aérea (BA) e das raízes (BR) de miniestacas e microestacas apicais e intermediárias, em condições de pleno sol, de quatro clones híbridos de *Eucalyptus globulus* (C04, C16, C26 e C30) aos 60 dias, em função do tratamento com regulador de crescimento AIB.

Tabela 2. Rooting and roots observed at the bottom of the container (RFT), root numbers (NR), root collar diameter, height and biomass of shoots (BA) and roots (BR) of apical and intermediate mini-cuttings and micro-cuttings, in the phase of growth in full sun of the four *Eucalyptus globulus* hybrid clones (C04, C16, C26 e C30) at 60 days, depending on treatment with IBA.

Clone	AIB (mg L ⁻¹)	Tipo de estaca	Técnica	Crescimento a pleno sol						
				ENR (%)	RFT (%)	NR	DC (mm)	ALT (cm)	BA (g)	BR (g)
C04	0	Apical	Miniestaca	78,1 Aa	46,9 Aa	2,2 Ab	4,2 Ab	10,3 Aa	1,82 Aa	0,73 Aa
			Microestaca	84,4 Aa	62,5 Aa	2,6 Aa	5,0 Aa	10,9 Aa	2,08 Aa	0,83 Aa
		Intermediária	Miniestaca	68,8 Ba	18,8 Ba	1,4 Bb	3,5 Bb	5,68 Ba	0,66 Ba	0,55 Ba
			Microestaca	68,8 Ba	34,4 Ba	1,9 Ba	4,6 Ba	4,49 Ba	0,69 Ba	0,55 Ba
	2000	Apical	Miniestaca	78,1 Aa	40,6 Aa	1,9 Ab	5,0 Ab	10,3 Aa	2,13 Aa	0,57 Aa
			Microestaca	84,4 Aa	68,8 Aa	2,4 Aa	6,4 Aa	11,7 Aa	2,31 Aa	0,53 Aa
		Intermediária	Miniestaca	71,9 Ba	18,8 Ba	1,4 Bb	4,6 Bb	5,37 Ba	0,92 Ba	0,18 Ba
			Microestaca	78,1 Ba	37,5 Ba	1,8 Ba	5,1 Ba	5,77 Ba	0,93 Ba	0,25 Ba
C16	0	Apical	Mini estaca	65,6 Ab	37,5 Aa	2,5 Aa	6,2 Aa	12,6 Ab	2,73 Aa	0,97 Aa
			Microestaca	90,6 Aa	43,8 Aa	3,2 Aa	5,4 Aa	15,0 Aa	2,96 Aa	0,69 Aa
		Intermediária	Miniestaca	75,0 Ab	37,5 Aa	1,8 Ba	8,0 Aa	6,39 Bb	1,82 Ba	0,42 Aa
			Microestaca	90,6 Aa	46,9Aa	2,0 Ba	7,2 Aa	9,36 Ba	2,39 Ba	0,48 Aa
	2000	Apical	Miniestaca	53,1 Ab	53,1 Aa	1,8 Aa	6,2 Aa	12,6 Ab	2,40 Aa	0,33 Aa
			Microestaca	62,5 Aa	56,3 Aa	2,4 Aa	5,4 Aa	14,0 Aa	2,17 Aa	0,57 Aa
		Intermediária	Miniestaca	46,9 Ab	46,9 Aa	1,4 Ba	4,9 Aa	6,80 Bb	1,32 Ba	0,45 Aa
			Microestaca	62,5 Aa	50,0 Aa	2,0 Ba	4,9 Aa	7,80 Ba	0,90 Ba	0,21 Aa
C26	0	Apical	Miniestaca	78,1 Aa	81,3 Aa	2,3 Aa	4,5 Aa	12,8 Ab	1,94 Aa	0,96 Aa
			Microestaca	87,5 Aa	87,5 Aa	2,2 Aa	5,9 Ab	13,5 Aa	2,66 Aa	0,66 Aa
		Intermediária	Miniestaca	62,5 Aa	46,9 Ba	1,9 Ba	4,0 Aa	5,95 Bb	1,14 Ba	0,56 Ba
			Microestaca	87,5 Aa	46,9 Ba	1,9 Ba	5,1 Ab	7,36 Ba	1,52 Ba	0,23 Ba
	2000	Apical	Miniestaca	87,5 Aa	62,5 Aa	2,7 Aa	5,0 Ab	10,9 Ab	2,42 Aa	0,66 Aa
			Microestaca	75,0 Aa	50,0 Aa	2,2 Aa	5,9 Aa	13,7 Aa	2,15 Aa	0,56 Aa
		Intermediária	Miniestaca	75,0 Aa	40,6 Ba	1,3 Ba	4,9 Aa	5,74 Bb	0,59 Ba	0,29 Ba
			Microestaca	68,8 Aa	37,5 Ba	1,5 Ba	5,8 Ab	6,05 Ba	0,87 Ba	0,20 Ba
C30	0	Apical	Miniestaca	75,0 Ab	34,4 Ab	2,5 Ab	5,6 Aa	11,8 Ab	1,02 Ab	0,43 Ab
			Microestaca	81,3 Aa	59,4 Aa	3,4 Aa	7,2 Aa	12,6 Aa	1,89 Aa	0,60 Aa
		Intermediária	Miniestaca	62,5 Ab	25,0 Ab	2,1 Ab	6,9 Aa	7,18 Bb	1,68 Ab	0,18 Bb
			Microestaca	81,3 Aa	46,8 Aa	3,0 Aa	7,1 Aa	8,66 Ba	1,81 Aa	0,39 Ba
	2000	Apical	Miniestaca	53,1 Ab	34,4 Ab	2,0 Ab	6,9 Aa	11,0 Ab	0,88 Ab	0,35 Ab
			Microestaca	59,4 Aa	59,3 Aa	2,9 Aa	6,2 Aa	13,9 Aa	1,92 Aa	0,54 Aa
		Intermediária	Miniestaca	46,9 Ab	31,3 Ab	1,1 Ab	6,6 Aa	6,25 Bb	0,89 Ab	0,23 Bb
			Microestaca	59,4 Aa	59,3 Aa	2,8 Aa	5,5 Aa	7,15 Ba	1,68 Aa	0,91 Ba

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula entre técnicas de propagação (Mini e Micro) e dentro de um mesmo tipo de estaca (apical e intermediária) e as seguidas de uma letra maiúscula entre tipo de estaca (apical e intermediária) dentro da mesma técnica de propagação (Mini e Micro) não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

foi encontrada somente para o clone C30. De modo geral, os percentuais de raízes observadas na extremidade inferior do tubete foram inferiores aos de enraizamento indicando a menor capacidade rizogênica dos materiais genéticos de *E. globulus*, híbridos ou não (LE ROUX; VAN STADEN, 1991; SERRANO *et al.*, 1996).

Em relação ao número de raízes, observou que as microestacas foram superiores às miniestacas para os clones C04 e C30. Para essa característica as miniestacas/microestacas apicais apresentaram médias superiores às intermediárias nos clones C04, C16 e C26, não sendo observada diferença para o clone C30 (Tabela 2). Esses resultados

provavelmente se devem à aquisição de maior juvenilidade por parte das microestacas, sendo que para os propágulos apicais, além do incremento nos percentuais de enraizamento com o aumento de juvenilidade destes, nota-se maior vigor radicular e conseguinte benefício no aumento do número de raízes (WENDLING; XAVIER, 2005a).

Dentre os clones estudados, observou-se que a microestaca no clone C30, no geral, apresentou superioridade para o enraizamento, raiz observada na extremidade inferior do tubete, número de raiz, altura e biomassa da parte aérea e das raízes (Tabela 2). Estes resultados evidenciaram uma maior dificuldade de propagação do clone C30

por meio da miniestaquia, o que refletiu nas maiores diferenças observadas entre o enraizamento de microestacas e miniestacas, confirmando a sugestão de que o clone foi rejuvenescido *in vitro*.

De maneira geral, para os clones estudados, a aplicação de AIB mostrou-se desnecessária para as miniestacas e microestacas, semelhante ao encontrado por Borges *et al.* (2011), trabalhando com miniestacas de clones híbridos de *E. globulus* com 2000 mg L⁻¹ de AIB, o qual obteve melhores resultados quando não se utilizou o regulador de crescimento. No entanto, a resposta dos clones em relação à utilização de AIB está

associada a condições de maturação do material, diferenças do material genético e condições ambientais, entre outros fatores (TITON *et al.*, 2002), dificultando explicar a ausências de diferenças entre miniestacas e microestacas, bem como os efeitos do rejuvenescimento *in vitro*.

Velocidade de enraizamento de miniestacas e microestacas

De acordo com a distribuição dos dados de porcentagem de estacas com algum grau de modificação (PMM), o modelo que melhor representou a distribuição dos dados foi do tipo

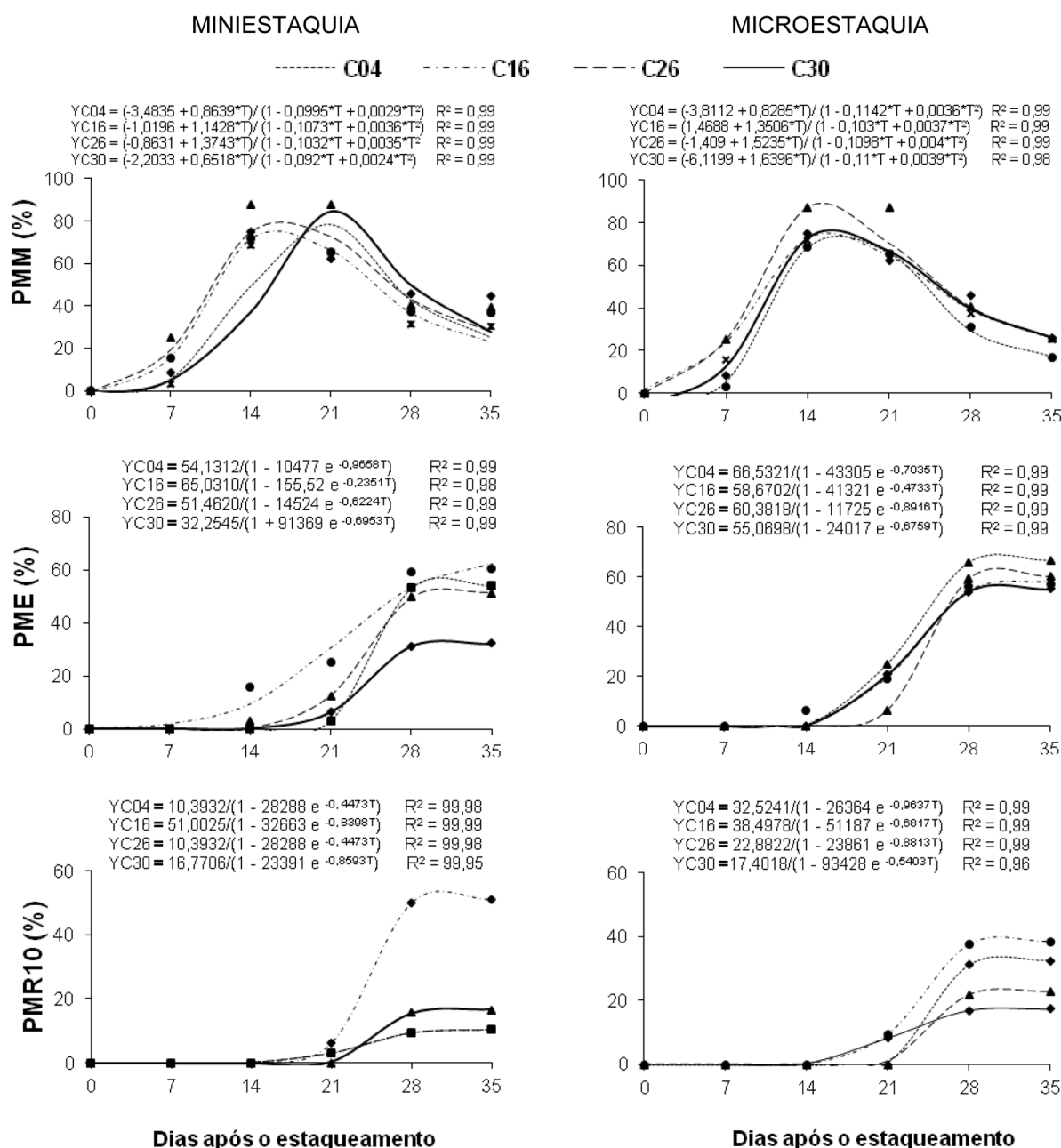


Figura 1. Porcentagem de miniestacas e microestacas modificadas (PMM), enraizadas (PME) e com raízes maiores que 10 cm (PMM10) em dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e dois de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C26 e C30), em função do tempo de avaliação.

Figure 1. Percentage of modified micro- and mini-cuttings (PMM); rooted (PME) and roots larger than 10 cm (PMM10) of two clones of *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) and two of *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C26 e C30), according to evaluation time.

$Y = (a+bT)/(1+cT+dT^2)$ (Figura 1), em que Y = porcentual de miniestacas modificadas e T = número de dias após o estaqueamento. As curvas ajustadas para os clones permitiram distinguir respostas variadas quanto à velocidade de enraizamento, tanto na miniestaquia como na microestaquia (Figura 1). As avaliações demonstraram que os clones C04 e C30 quando propagados via miniestaquia, comparativamente à microestaquia, necessitaram de maior número de dias para atingir maior porcentagem de miniestacas com a base modificada.

Com relação aos dados de porcentagem de miniestacas e microestacas enraizadas (PME) e com raízes maiores que 10 cm (PMR10), o modelo que apresentou o melhor ajuste para os quatro clones híbridos de *Eucalyptus globulus* foi o logístico, $Y = \alpha (1 + \beta e^{-\gamma T})^{-1}$, em que: Y = porcentagem de enraizamento ou porcentagem de estacas com raízes maiores que 10 cm e T = número de dias após o estaqueamento.

Em relação à porcentagem de miniestacas enraizadas esta foi mais rápida e maior para o clone C16, o qual apresentou em torno de 10% das miniestacas enraizadas, aos 14 dias e aos 35 dias, em torno de 65% (Figura 1). Resultado diferente ao encontrado por Goulart (2007) a qual observou em até 12 dias de idade, a formação endógena de primórdios radiculares e a formação de calos em miniestacas apicais de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Os resultados referentes à microestaquia diferiram da miniestaquia, sendo observados maiores porcentagens de microestacas enraizadas para os clones C04, C26 e C16 com 66,5%, 60% e 55% de enraizamento, respectivamente (Figura 1).

A diferença mais acentuada ocorreu para o clone C30, em relação à miniestaquia para a microestaquia. A partir do 14º dia já se constatava a presença de raízes adventícias nas microestacas, enquanto nas miniestacas havia presença de calo na base. O resultado é semelhante ao encontrado no experimento de enraizamento de miniestacas e microestacas em relação à utilização do regulador de crescimento AIB, no qual ocorreu maior porcentual de enraizamento das microestacas (Tabela 2). Este resultado, em parte, pode ser explicado pelo rejuvenescimento e, ou, revigoramento promovido pela micropropagação (HARTMANN *et al.*, 2002).

Os clones propagados por meio da miniestaquia tiveram baixos percentuais de miniestacas enraizadas e com raízes com tamanho superior

a 10 cm, conforme observado para os clones C04, C16 e C26, exceto para o clone C16, para o qual obteve-se porcentual de 51% para essa característica avaliada (Figura 1).

Com base nas observações feitas, as microestacas apresentaram menor oxidação da base das estacas bem como baixo porcentual de cauleamento sendo constatada a emergência da maioria das raízes diretamente das estacas, sem a formação de calo. Estas evidências podem ser decorrentes do maior vigor vegetativo por parte das microestacas, explicando, assim, a melhor resposta ao enraizamento observado para os propágulos oriundos da microestaquia.

Os resultados obtidos para os híbridos de *E. globulus* demonstraram a necessidade de permanência por um tempo maior das miniestacas e microestacas na casa de vegetação, em comparação aos híbridos de *E. urophylla* e de *E. grandis*. Essa resposta deve-se à recalcitrância ao enraizamento por parte desse material genético. Constatou-se assim que o genótipo afeta diretamente a capacidade e a velocidade de enraizamento das estacas, semelhante encontrado por Mankessi *et al.* (2009) avaliando o enraizamento *in vitro* de dois clones meio irmãos híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, com a mesma idade, para os quais constataram acentuada diferenças na capacidade de enraizamento.

O enraizamento de miniestacas e microestacas dos clones estudados também está ligado ao genótipo do *E. globulus* que apresenta um comportamento recalcitrante ao processo rizogênico, assim como praticamente todas as espécies de clima subtropical (BRONDANI *et al.*, 2010b). Isso implica diretamente no aumento do período de permanência em casa de vegetação e para obtenção de mudas com qualidade suficiente para plantio, comparativamente ao tempo de formação de mudas clonais de *Eucalyptus urophylla*, *E. grandis* e seus híbridos. Portanto, a microestaquia justifica-se em virtude da maior velocidade de enraizamento observada para as microestacas, obtendo-se ganhos em produtividade e redução nos custos de produção pela otimização do uso das estruturas de propagação, uma vez que as estacas são retiradas no momento mais adequado (FERREIRA *et al.*, 2004).

O rejuvenescimento clonal pela micropropagação é avaliado principalmente através dos percentuais de enraizamento das estacas dos materiais genéticos, bem como pela velocidade do processo de rizogênese. Contudo, a ausência de superioridade expressiva da microestaquia

em relação à miniestaquia pode ser devido ao número de subcultivos, durante a micropropagação, não ter sido suficiente para promover um adequado rejuvenescimento dos clones. Além disso, a rizogênese em estacas apresenta diversas respostas em função da interação de vários fatores, como o material genético (BRONDANI *et al.*, 2010a; TITON *et al.*, 2002; WENDLING *et al.*, 2000; WENDLING; XAVIER, 2005b), aplicação de regulador de crescimento (ALMEIDA *et al.*, 2007), época do ano, temperatura, luminosidade, fotoperíodo, juvenilidade (ALFENAS *et al.*, 2009; ASSIS; MAFIA, 2007; BRONDANI *et al.*, 2010b), dentre outros que podem provocar variações no enraizamento das microestacas.

CONCLUSÕES

O regulador de crescimento (AIB) não proporcionou efeito significativo para o enraizamento das miniestacas e microestacas apicais e intermediárias.

As microestacas apresentaram maior velocidade de enraizamento adventício na casa de vegetação.

AGRADECIMENTOS:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à empresa Celulose Nipo-Brasileira S.A. (CENIBRA), pelo apoio financeiro e esta última também pela disponibilização de material genético (clones).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. *Clonagem e doenças do eucalipto*. 2.ed. Viçosa: UFV, 2009. 500p.

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

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

BENNETT, I.J.; McCOMB, J.A.; TONKINI, C.M.; McDAVID, D.A.J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *Annals of Botany*, Oxford, v.74, n.1, p.53-58. 1994.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; MELO, L.A.; ROSADO, M.A. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Revista Árvore*, Viçosa, v.35, n.3, p.425-434. 2011.

BRONDANI, G. E.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, M. A. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v.32, n.4, p.667-674. 2010a.

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*: (ii) sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estações do ano. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v.20, n.3; p.453-465. 2010b.

CALDERÓN-BALTIERRA, X.; MONTENEGRO G.; GARCIA, E. Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globulus*. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, Washington, v.40, n.5, p.499-503. 2004.

FERREIRA, E.M.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; LEITE, H.G.; SARTÓRIO, R.C.; PENCHEL FILHO, R.M. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. *Revista Árvore*, Viçosa, v.28, n.2, p.183-187, 2004.

GOULART, P.B. *Influência do acondicionamento, antioxidantes, auxinas e seus cofatores no enraizamento de miniestacas de clones de Eucalyptus grandis x E. urophylla*. 2007. 115p. . Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E; DAVIS JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. *Plant propagation: principles and practices*. 7.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880p.

LE ROUX, J.J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* – an review. *Tree Physiology*, Victoria, v.9, p.435-477. 1991.

- MANKESSI, F.; SAYA, A.; BAPTISTE, C.; NOURISSIER-MOUNTOU, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. *Trees*, Berlin, v.23, n.5, p.931-940. 2009.
- MELO, L.A. **Armazenamento, aplicação de antioxidantes e otimização do tempo em casa de vegetação no enraizamento de miniestacas de híbridos de *Eucalyptus grandis*.** 2009. 58p. . Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa.
- PAIM, D.C.; RUEDELL, C.M.; SCHWAMBACH, J.; FETT NETO, A.G. Physiological characterization of adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* x *maidenii* minicuttings. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 10., 2005, Recife. *Anais...* Campinas: SBFV, 2005, p.34-37.
- SERRANO, L.; ROCHANGE, F.; SEMBLAT, J. P.; MARQUE, C.; TEULIÈRES C.; BOUDET, A. M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of producers for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. *Journal Experimental Botanic*, Oxford, v.47, p.285–290, 1996.
- TITON, M. **Indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*.** Viçosa, MG: UFV. 2005. 106p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, Viçosa, v.26, n.6, p.665-673. 2002.
- WATT, M.P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.75, n.3, p.233-240. 2003.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, v.29, n.5, p.681-689. 2005a.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, Viçosa, v.29, n.6, p.921-930. 2005b
- WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J.M.; PIRES, I.E.; ANDRADE, H.B. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. *Revista Árvore*, Viçosa, v.24, n.2, p.181-186. 2000.
- XAVIER, A., COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. *Revista Árvore*, Viçosa, v.20, n.1, p.9-16. 1996.
- XAVIER A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa: UFV, 2009. 272p.

Recebido em 26/09/2011

Aceito para publicação em 09/08/2012