

**MORFOANATOMIA DA RIZOGÊNESE ADVENTÍCIA EM MINIESTACAS DE
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla***

**MORPHO-ANATOMIC OF ADVENTITIOUS RHIZOGENESIS IN MINI-CUTTINGS OF
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla***

Patrícia Bueno Goulart¹ Aloisio Xavier² Lourdes Iarema³ Wagner Campos Otoni⁴

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo principal a caracterização morfoanatômica da rizogênese adventícia de miniestacas de quatro clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. As miniestacas foram coletadas de minicepas estabelecidas em minijardim clonal, conduzido em sistema semi-hidropônico em canaletas com fertirrigação. Para a caracterização histológica do processo de rizogênese das miniestacas foram coletadas amostras teciduais aos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias após o estaqueamento em casa de vegetação climatizada, para enraizamento. As amostras foram fixadas em FAA_{70%}, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato. Os resultados revelaram a origem endógena de primórdios radiculares a partir do câmbio vascular e, em alguns casos, a proliferação e a formação de uma massa de células desorganizadas (calos) em miniestacas dos clones avaliados, entre 8 e 12 dias de idade.

Palavras-chave: miniestaquia; propagação vegetativa; anatomia.

ABSTRACT

The present work aimed to accomplish the histological analysis of the events involved in the adventitious rooting pattern of four *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* clones. The mini-cuttings were collected from a mini-stump and the rooting experiments were set up under mini-hedge indoor semi-hydroponics by means of intermittent flooding fertirrigation. For histological analyses, the proximal ends of the mini-cuttings were collected after 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 days after planting them at greenhouse. After fixation with FAA_{70%}, the samples were dehydrated in a graded ethanol series and infiltrated overnight in metracrilate resin, and finally embedded in resin. It was verified the endogenous origin of adventitious root primordia from vascular cambium, and in some cases, the formation and proliferation of *calli* at the proximal end of the mini-cuttings within 8 to 12 days.

Keywords: mini-cuttings; vegetative propagation; anatomy.

INTRODUÇÃO

Desde a sua introdução no Brasil, a propagação vegetativa de clones *Eucalyptus* promoveu avanços consideráveis, principalmente relacionados ao processo de produção comercial

de mudas, onde é notória a evolução nas pesquisas relacionadas a miniestaquia e microestaquia. No entanto, estudos básicos sobre a caracterização morfoanatômica da rizogênese de miniestacas num processo de propagação clonal pela miniestaquia ainda são escassos na literatura científica.

1 Engenheira Florestal, Msc., Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, s/n, CEP 36570-000, Viçosa (MG), Brasil. pbgoulart@uol.com.br

2 Engenheiro Florestal, Dr., Professor Associado do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, s/n, CEP 36570-000, Viçosa (MG), Brasil. xavier@ufv.br

3 Bióloga, Dr., Analista Ambiental do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Parque Nacional do Juruena, Av. Ludovico da Riva Neto, 2364, Centro, CEP 78580-000, Alta Floresta (MT), Brasil. lourdesiarema@yahoo.com.br

4 Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Associado do Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, s/n, CEP 36570-000 Viçosa (MG), Brasil. wotoni@ufv.br

A formação de raízes em propágulos é um processo complexo, tanto do ponto de vista anatômico, quanto fisiológico, o qual está associado à desdiferenciação e ao redirecionamento do desenvolvimento de células vegetais competentes para a formação de meristemas que originarão raízes adventícias. Essas células retomam o ciclo celular, retomando a capacidade de divisão e formando o meristema radicular de maneira análoga à de raízes laterais. A origem e o desenvolvimento dessas raízes, geralmente endógena, sendo associada aos tecidos vasculares que crescem através dos tecidos localizados ao redor do seu ponto de origem (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e HAYASHI, 2003; MERCIER, 2004). Embora a divisão de fases possa variar de acordo com diferentes autores, a existência de três fases é consenso: *i*) Indução: em que eventos morfológicos não são claramente visualizados, compreendendo, portanto, modificações moleculares e bioquímicas prévias àquelas morfológicas; *ii*) Iniciação: onde as divisões celulares acontecem, culminando na formação de meristemas e estabelecimento de primórdios radiculares; *iii*) Expressão: em que ocorre a emergência e crescimento dos primórdios radiculares (GENEVE, 1991; HARTMANN et al., 2002; XAVIER et al., 2009). Obviamente, como a formação de primórdios radiculares é um processo assíncrono, essas etapas podem sobrepor temporalmente em estacas onde o enraizamento adventício esteja ocorrendo.

Segundo Fachinello et al. (1995), as raízes formadas nas estacas são respostas ao traumatismo produzido pelo corte e, dessa forma, dois aspectos são fundamentais: a desdiferenciação e a totipotência. Com o preparo da estaca, ocorrem injúrias nos tecidos em decorrência dos cortes, as quais são seguidas por reação cicatricial com formação da camada de suberina, que reduz a desidratação na área lesionada, ou a oxidação devido à liberação de compostos fenólicos (HARTMANN et al., 2002). Nessa região, frequentemente, formam-se calos constituídos por massas proliferativas e desdiferenciadas de células parenquimáticas, tipicamente desorganizadas, pouco diferenciadas e em diferentes graus de lignificação. Assim, as células que se tornam meristemáticas dividem-se e originam primórdios radiculares, ocorrendo diferenciação de raízes adventícias a partir de células adjacentes ao câmbio e ao floema secundário. Deve-se considerar que a formação de calo e de raízes são processos independentes na maioria das plantas, sendo que

a ocorrência simultânea é devido à dependência de condições internas e ambientais semelhantes. Entretanto, em algumas plantas, a formação de calo pode ser precursora da formação de raízes adventícias, como no caso do enraizamento *in vitro* de gemas de *Eucalyptus globulus*, cujas raízes adventícias originaram-se a partir de calos, em média, aos 12 dias de crescimento (BALTIERRA et al., 2004). Fato este também observado nas miniestacas de *Eucalyptus benthamii*, tratadas com 3.000 e 4.000 mg L⁻¹ de AIB, que após 14 dias de cultivo apresentaram formação de calos internos e aos 28 dias ocorreu a indução de raiz adventícia apresentando conexão com o câmbio vascular (BRONDANI, 2012).

Em plantas perenes lenhosas nas quais se encontra uma ou mais camadas de tecido do floema secundário, as raízes adventícias das estacas de ramos originam-se geralmente do tecido do floema secundário jovem (ALTMAN e WAISEL, 1996). Entretanto, essas raízes poderão surgir de outros tecidos, tais como: do câmbio, dos raios vasculares ou da medula. Nas espécies de difícil enraizamento, praticamente todas as raízes se originam do tecido cicatricial. Nesse tecido as raízes surgem principalmente por divisões do câmbio e do parênquima floemático ou de qualquer célula que mantenha a capacidade de desdiferenciação (ALTMAN e WAISEL, 1996). Algumas espécies, como a seringueira, são consideradas de difícil enraizamento devido à presença de um cilindro quase contínuo de tecidos lignificados que, juntamente com as barreiras químicas, dificultam a emissão de raízes (MEDRADO et al., 1995).

O sistema de clonagem de *Eucalyptus* tem sido baseado no enraizamento de estacas obtidas a partir de genótipos superiores de híbridos de *Eucalyptus urophylla* e, dessa forma, a propagação vegetativa constitui-se em importante ferramenta para aumentar a competitividade entre as empresas florestais, transformando os ganhos genéticos em benefícios para a indústria (ASSIS et al., 2004; XAVIER et al., 2009). Apesar da evolução das pesquisas visando à maximização do enraizamento de *Eucalyptus* nos últimos anos, ainda pouco se conhece sobre os fundamentos biológicos da formação de raízes adventícias no seu processo de enraizamento. Ainda que a propagação vegetativa por miniestaquia seja adotada pela maioria das empresas florestais, o conhecimento do padrão da rizogênese (tanto estrutural quanto temporal, considerando a velocidade de emissão dos primórdios radiculares),

através de estudos anatômicos, é importante como suporte no entendimento científico, facilitando e direcionando novas abordagens experimentais no sentido da maximização e otimização da propagação clonal de clones de *Eucalyptus*. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo a caracterização morfoanatômica da rizogênese adventícia de miniestacas de quatro clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material experimental

Foram utilizadas miniestacas de quatro clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (H1, H2, H3 e H4) provenientes de minicepas localizadas em um minijardim clonal, instalado em condições cobertas, no Viveiro Experimental da International Paper do Brasil (Mogi Guaçu/São Paulo).

Conforme a técnica de miniestaquia descrita em Xavier et al.(2009) e de acordo com os procedimentos de manejo adotados pela empresa International Paper do Brasil (Mogi Guaçu/São Paulo), o minijardim clonal foi constituído de minicepas, as quais foram obtidas a partir de mudas propagadas pelo enraizamento adventício de miniestacas, oriundas de brotações de plantas propagadas pelo método da microestaquia. Essas minicepas foram formadas a partir das miniestacas enraizadas, as quais, ao atingirem 10 a 12 cm de tamanho, tiveram seus ápices podados na altura de 8 cm, constituindo-se nas minicepas que forneceram as miniestacas (brotações) para a realização do experimento.

O sistema de manejo do minijardim clonal adotado foi o utilizado comercialmente pela empresa e composto por canaletas de alumínio revestidas com fibra de vidro, sobre as quais permaneceram as minicepas, plantadas em tubetes dispostos em bandejas de isopor cobertas por plástico dupla face. A irrigação e a nutrição mineral foram efetuadas através do sistema automatizado de fertirrigação por inundação, atingindo cerca de 6 cm de altura do tubete, de maneira que somente o sistema radicular permanecesse em contato com a solução nutritiva. A cada hora o sistema era acionado e irrigado por 20 minutos. Após esse período, a canaleta era esvaziada e a solução nutritiva retornava à caixa de armazenagem da solução, sendo essa trocada a cada sete dias.

Diariamente foi mensurado a Ec (condutividade elétrica, usada para determinar a quantidade de sais presentes na solução) e o pH da solução. Neste período, a Ec variou de 2,00 a 2,40 mS cm⁻¹ e o pH, de 3,05 a 5,76. Para cada 500 L de solução nutritiva, adicionaram-se 20 g de nitrato de amônio, 200 g de nitrato de cálcio, 108 g de sulfato de amônio, 60 g de micronutrientes obtidos pelo produto Quelatec AZ[®] e 740 g de Phytus Super K[®]. O Quelatec AZ[®] constitui-se de um quelato solúvel de micronutrientes composto por ferro, manganês, zinco e cobre, na forma quelatada, e por boro e molibdênio, na forma mineral. O Phytus Super K[®] foi constituído de um fertilizante composto por NPK (0:40:20).

Obtenção, preparo, plantio e enraizamento das miniestacas

As miniestacas foram coletadas do minijardim clonal e acondicionadas em caixas fechadas de PVC transparente. Para manter as condições de turgescência do material vegetativo, pulverizou-se água, utilizando uma bomba costal, em intervalos de dez minutos, até a etapa do plantio para o enraizamento. Posteriormente, as miniestacas foram preparadas com dimensões variando de 5 a 7 cm de comprimento e com um par de folhas, tendo a área foliar reduzida à metade de seu tamanho original. O período compreendido entre o preparo das miniestacas e o plantio no substrato, na casa de vegetação, foi sempre inferior a 30 minutos.

No enraizamento das miniestacas, utilizaram-se como recipientes tubetes plásticos de 55 cm³ de capacidade, contendo substrato constituído por vermiculita de granulometria fina e casca de arroz carbonizada (1:1). A nutrição mineral utilizada no substrato foi composta por 4,00 kg m⁻³ de Fosmag 500B (MANAH, São Paulo) com 4% de N, 14% de P, 7% de K, 14% de Ca, 9% de S, 2% de Mg e 0,5% de B; 5,40 kg m⁻³ de NPK (32:0:3) e 3,06 kg m⁻³ de KCl. Não foi utilizado regulador de crescimento.

O processo de enraizamento das miniestacas foi conduzido em casa de vegetação climatizada (umidade relativa do ar \geq 80% e temperatura em torno de 27°C) com permanência de até 12 dias (referente ao último tratamento utilizado).

Avaliações experimentais

Para análise histológica da rizogênese

foram coletadas dez amostras por clone para cada tratamento (T), sendo T1 - miniestacas coletadas sem efetuar o plantio no substrato; T2 - miniestacas coletadas com 01 dia após o plantio; T3 - miniestacas com 02 dias após o plantio; T4 - miniestacas com 04 dias após o plantio; T5 - miniestacas com 06 dias após o plantio; T6 - miniestacas com 08 dias após o plantio; T7 - miniestacas com 10 dias após o plantio e T8 - miniestacas com 12 dias após o plantio, sendo os resultados interpretados pela análise descritiva.

As amostras foram retiradas aleatoriamente e fixadas em FAA_{70%} durante 24 horas, sob vácuo (JOHANSEN, 1940). Em seguida, foram imersas em álcool etílico 70% (v/v), onde permaneceram armazenadas, sendo novamente submetidas a vácuo por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram levadas ao Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), para o processamento e montagem de laminário referência.

O material fixado foi desidratado em série etílica e emblocado em metacrilato (Historesin®, Leica). Seções transversais e longitudinais de 8 µm de espessura foram obtidas da região basal das miniestacas, em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica), com navalha de vidro. Para análise estrutural, os cortes foram corados em azul de toluidina pH 4,0 (O'BRIEN e McCULLY, 1981). As lâminas permanentes foram montadas em resina sintética Permount®.

As observações e fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio Olympus (modelo AX70TRF, Japão) equipado com sistema U-photo (Olympus, Japão) no Laboratório de Anatomia Vegetal (DBV/UFV).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas caracterizações histológicas da rizogênese das miniestacas dos clones (H1, H2, H3 e H4), à semelhança do observado no clone H1 (Figura 1) e aos demais clones, verificou-se a presença de epiderme (Ep) íntegra e região cortical formada por células parenquimáticas com paredes finas (parênquima cortical, Pc), e com idioblastos contendo óleo (Id) apresentando-se distribuídos no córtex (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5). A região vascular, decorrente da atividade do câmbio vascular (Cv), foi constituída por células do xilema (XI), em maior proporção, e do floema (Fl) secundários (Figuras 1B, 1E, 1H e 1K). No centro dos cortes transversais,

pode-se observar a presença da medula (Md), constituída por células parenquimáticas (Figuras 1B, 1C, 1E, 1F, 1H, 1I, 1K e 1L).

Para o clone H1, nos cortes realizados na região basal das miniestacas com até seis dias após o plantio no substrato, objetivando o enraizamento na casa de vegetação (Figuras 1 A-L e 2 A-C), não foi verificada a formação de primórdios radiculares. No entanto, a partir de oito dias após o plantio na casa de vegetação (Figuras 2 D-F), observou-se o desenvolvimento e a formação endógena de primórdios radiculares a partir do câmbio vascular, com progressão de formação dos primórdios aos 10 (Figuras 2 H-K) e 12 dias (Figuras 2 L-N), evidenciada em ambos os planos de corte, mediante a emergência e o alongamento dos mesmos (Figuras 2 H-L).

Para o clone H2, também na casa de vegetação, não se verificou a formação de primórdios radiculares até 8 dias após o plantio para enraizamento (Figuras 3 A-F). A partir de 10 dias na casa de vegetação (Figuras 3 G-N) constatou-se, semelhantemente ao descrito para o clone H1, formação endógena de primórdios radiculares a partir do câmbio vascular, sem prévia formação de calo.

Alguns estudos que relatam os processos de enraizamento *in vitro* em espécies florestais indicam que as raízes adventícias são usualmente originárias de células parenquimáticas do floema secundário mais jovem, mas também podem se originar a partir de outros tecidos como câmbio, raios vasculares, lenticelas ou medula (GINZBURG, 1967; HARTMANN et al., 2002; BALTIERRA et al., 2004; BEYL e TRIGIANO, 2008; BRONDANI, 2012). Tal fato pode estar relacionado com a elevada capacidade de reprogramação das células cambiais e parenquimáticas do floema. Assim, com as sucessivas divisões celulares, ocorre a formação do primórdio radicular com origem endógena e desenvolvimento direcionado à periferia da estaca.

Baltierra et al. (2004), por exemplo, verificaram que no enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* as raízes adventícias se originaram a partir de calos aos 12 dias, completando o processo de rizogênese aos 15 dias de crescimento em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). A formação *in vitro* de raízes foi variada, podendo ser originada de tecidos vasculares mais desenvolvidos ou de tecidos jovens que originarão o xilema, sendo que a maioria das mudanças ocorridas no parênquima cortical pode conduzir a formação

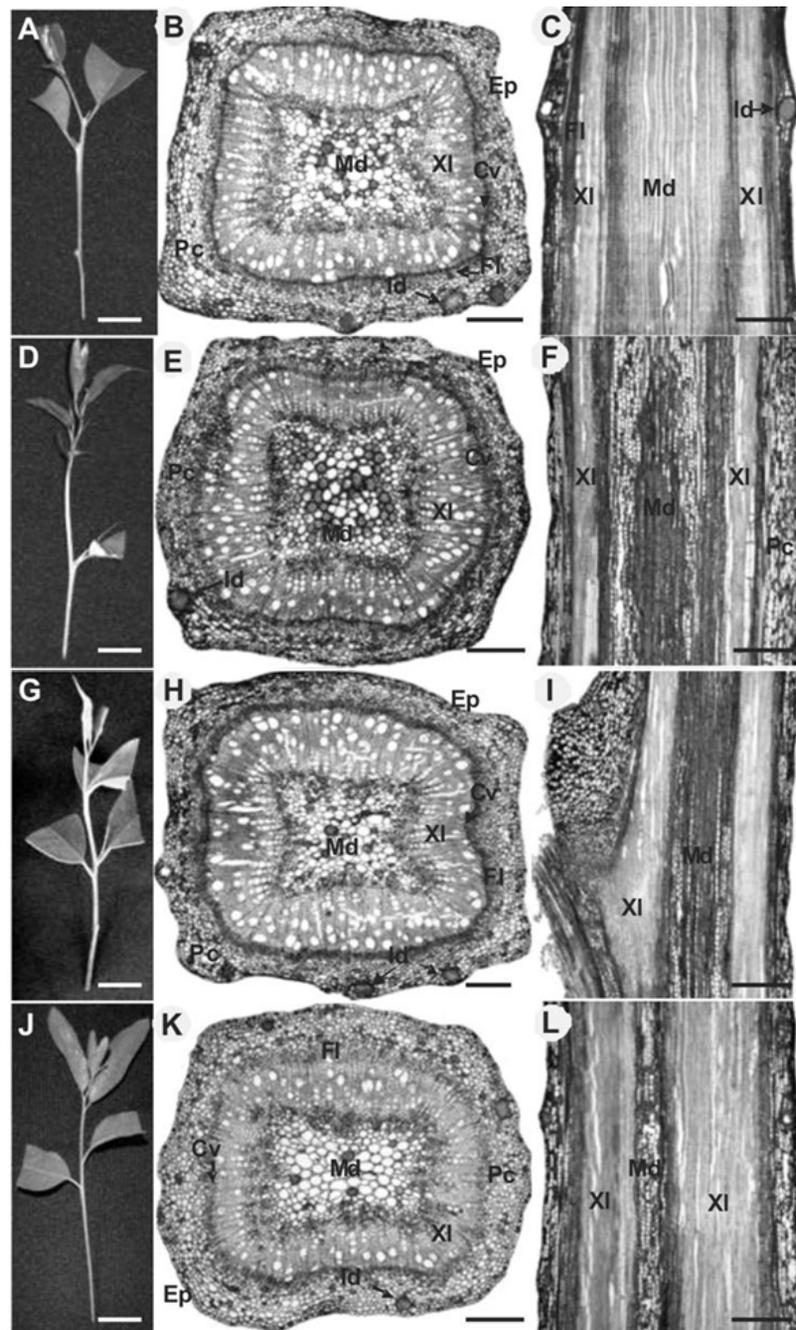


FIGURA 1: Miniestacas e micrografias de cortes histológicos na base de miniestacas do clone H1 após coleta das mesmas sem efetuar o plantio no substrato (A, B e C); e miniestacas coletadas 1 (D, E e F); 2 (G, H e I); e 4 (J, K e L) dias após o plantio em substrato. B, E, H e K: cortes transversais. C, F, I e L: cortes longitudinais. Id = idioblastos com óleo; Ep = epiderme; Fl = floema secundário; Md = medula; Pc = parênquima cortical; XI = xilema secundário. Barras: A, D, G e J = 10 mm; B, H e F = 30 μ m; C e I = 50 μ m; E = 31 μ m; K = 23 μ m; L = 64 μ m.

FIGURE 1: Mini-cuttings and micrographies of histological sections in mini-cuttings of clone H1 after the following treatments: mini-cuttings harvested previously to planting in substrate (A, B and C); mini-cuttings harvested at 1 (D, E and F); 2 (G, H and I); and 4 (J, K and L) days after planting in substrate. B, E, H and K: cross sections; C, F, I and L: longitudinal sections. Id = idioblasts containing oil; Ep = epidermis; Fl = secondary phloem; Md = pith; Pc = cortical parenchyma; XI = secondary xylem. Bars = A, D, G and J = 10 mm; B, H and F = 30 μ m; C and I = 50 μ m; E = 31 μ m; K = 23 μ m; L = 64 μ m.

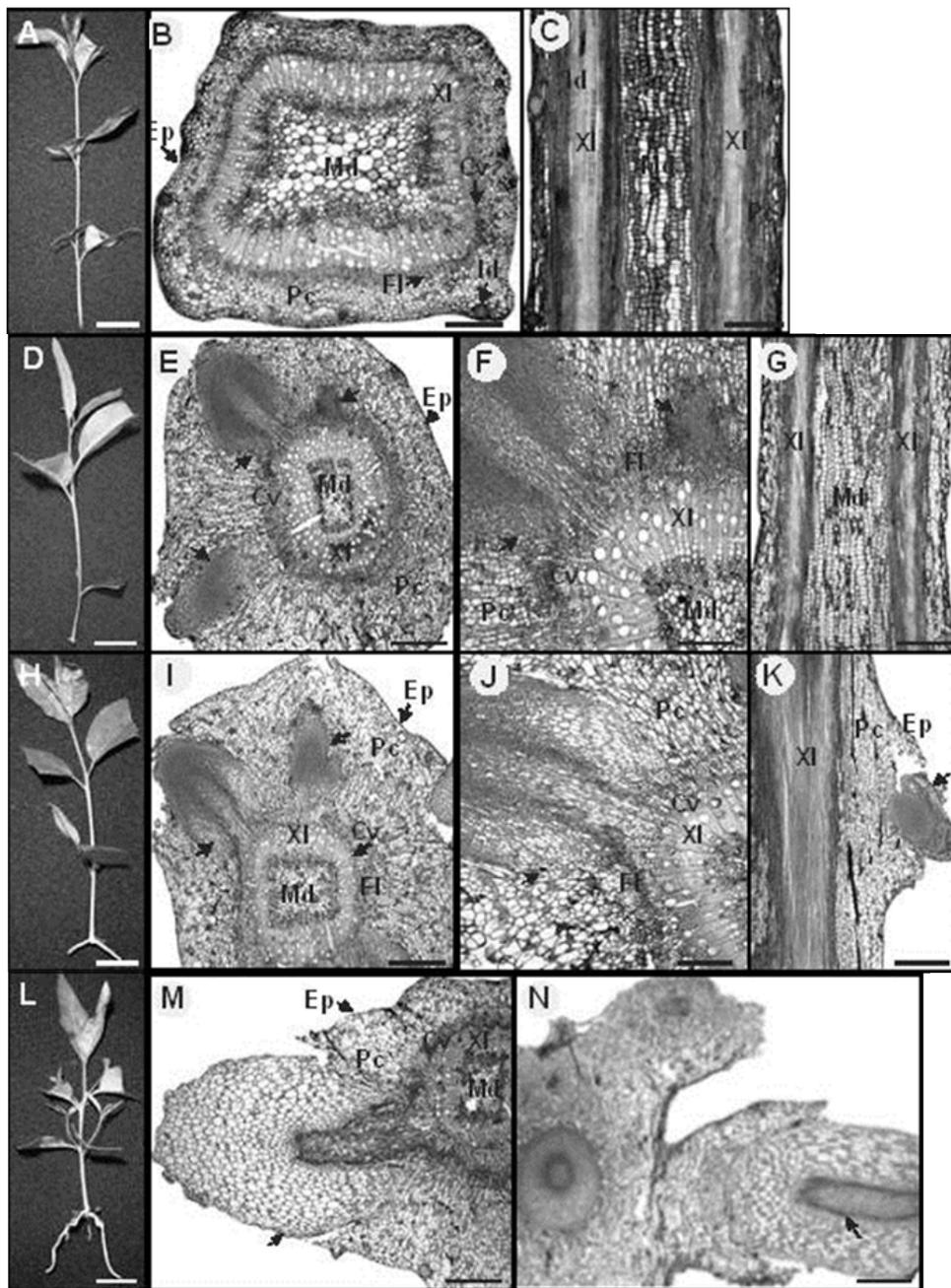


FIGURA 2: Miniestacas e micrografias de cortes histológicos na base de miniestacas do clone H1 aos 6 (A, B e C); 8 (D, E, F e G); 10 (H, I, J e K); e 12 dias (L, M e N) após o plantio em substrato. B, E, F, I, J e M: cortes transversais. C, G, K e N: cortes longitudinais. I e M: detalhes do corte transversal da miniestaca mostrando o desenvolvimento e a formação endógena do primórdio radicular a partir do câmbio vascular (Cv). Id = idioblastos com óleo; Ep = epiderme; Fl = floema secundário; Md = medula; Pc = parênquima cortical; Xl = xilema secundário. Barras: A, D, H e L = 10 mm; B = 38 μ m; C = 52 μ m; E, I = 55 μ m; F = 23 μ m; G, N = 64 μ m; J = 24 μ m; K = 80 μ m; M = 45 μ m.

FIGURE 2: Mini-cuttings and micrographies of histological sections in mini-cuttings of the clone H1 harvested at 6 (A, B and C); 8 (D, E, F and G); 10 (H, I, J and K); and 12 (L, M and N) days after planting in substrate. B, E, F, I, J and M: cross sections; C, G, K and N: longitudinal sections. Id = idioblasts containing oil; Ep = epidermis; Fl = secondary phloem; Md = pith; Pc = cortical parenchyma; Xl = secondary xylem. Bars: A, D, H, L = 10 mm; B = 38 μ m; C = 52 μ m; E, I = 55 μ m; F = 23 μ m; G, N = 64 μ m; J = 24 μ m; K = 80 μ m; M = 45 μ m.

in vitro e crescimento de raízes adventícias em *Eucalyptus globulus*.

Brondani (2012), em seu estudo sobre aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*, observou que a aplicação de AIB nas miniestacas favoreceu a indução de raízes, sendo que a concentração de 2.000 mg L⁻¹ promoveu maior velocidade e porcentagem de enraizamento. E, de acordo com as análises histológicas da rizogênese, foi verificada formação de centros meristemáticos junto ao câmbio vascular, sendo que a raiz adventícia apresentou conexão direta com o câmbio vascular.

Para o clone H3, semelhantemente ao ocorrido no clone H1, com até seis dias de plantio no substrato, para o enraizamento na casa de vegetação, não se observou a formação de primórdios radiculares (Figuras 4 A-C). Aos oito dias (Figura 4D) após o plantio não foram obtidos cortes transversais das miniestacas avaliadas que comprovassem a formação endógena de primórdios radiculares (Figuras 4 E-G). Contudo, o corte longitudinal permitiu a visualização de um primórdio radicular seccionado transversalmente (Figuras 4 F-G). A partir de 10 dias após o plantio em substrato (Figuras 4 H-J), ocorreu a formação e o desenvolvimento de calos, evidenciados após transcorridos 12 dias do plantio (Figura 4K). Porém, em todas as miniestacas avaliadas, mesmo com a formação de calos a partir da proliferação celular na região cambial (Figuras 4I, 4L e 4M), não houve rizogênese no intervalo analisado.

Para o clone H4, o padrão de diferenciação inicial dos tecidos seguiu o observado para os demais clones. Todavia, não ocorreu formação de primórdios radiculares nas miniestacas com até 8 dias após o plantio, para enraizamento na casa de vegetação (Figuras 5 A-F). Notavelmente, a partir de 10 dias (Figuras 5 H-N) não foi constatada a formação endógena de primórdios radiculares a partir do câmbio vascular, conforme evidenciado pelos cortes longitudinais (Figuras 5J e 5N). Houve apenas a formação de calos nessa região (Figuras 5 G-I e 5 K-M). Esse fato pode estar relacionado ao balanço hormonal endógeno entre citocininas/auxinas, favorecendo o desenvolvimento de calos na região basal das miniestacas (HARTMANN et al., 2002), uma vez que não foram utilizadas fontes exógenas de reguladores de crescimento em nenhuma das etapas do preparo e condução do presente experimento. Outros fatores também podem ter contribuído para formação de calos como:

as características do material genético (dificuldade de enraizamento sem utilização de regulador de crescimento) e a degradação de auxinas na região basal do propágulo devido à permanência por muito tempo em elevada temperatura e umidade relativa do ar, efeito que pode prejudicar a indução de raiz adventícia e favorecer a formação de calo na região basal (RASMUSSEM et al., 2009). Dessa forma, é importante também estabelecer um tempo ótimo de permanência em casa de vegetação para otimizar a produção de mudas e minimizar as perdas.

Brondani (2012) observou que o tratamento das miniestacas sem a presença de AIB apresenta a emissão de raízes somente após 28 dias (22,2% de enraizamento), já quando aplicado AIB nas concentrações iguais ou superiores a 2.000 mg L⁻¹ obteve maior velocidade e indução de raízes adventícias. Logo, as condições fisiológicas da planta doadora de propágulos dependem de um conjunto de fatores intrínsecos que poderão ou não atuar no metabolismo da planta, na ocasião da coleta das estacas, os quais influenciarão a rizogênese das referidas estacas (NORBERTO, 1999; HARTMANN et al., 2002). A formação de raízes adventícias é, portanto, dependente da presença de certos níveis endógenos de substâncias de crescimento da planta, sendo algumas mais favoráveis que outras (LI et al., 2009; ZHU et al., 2010).

Os padrões anatômicos de enraizamento adventício podem ser diretos ou indiretos. No padrão direto preconiza-se a ocorrência de células competentes que, após a indução, iniciam divisões celulares num padrão polar de diferenciação de primórdios. No padrão indireto da rizogênese adventícia há envolvimento de um estado inicial não competente, em que as células são inábeis em responder a estímulos indutivos; após a indução, divisões celulares indiretas ocorrem com formação de calo na região basal, previamente à diferenciação de primórdios (GENEVE 1991; HARTMANN et al., 2002). Nos clones H3 e H4 houve a formação de calo na base das miniestacas, o que pode caracterizar o padrão indireto da rizogênese, entretanto, não foi observada na análise histológica que comprovasse tal fato.

De modo geral, o sucesso do enraizamento se deve principalmente a dois fatores: *i*) há tendência dessas miniestacas de enraizar com mais facilidade, pois apresentam tecidos mais tenros, não havendo a presença de um anel de esclerênquima lignificado, que dificultaria a emissão dos primórdios

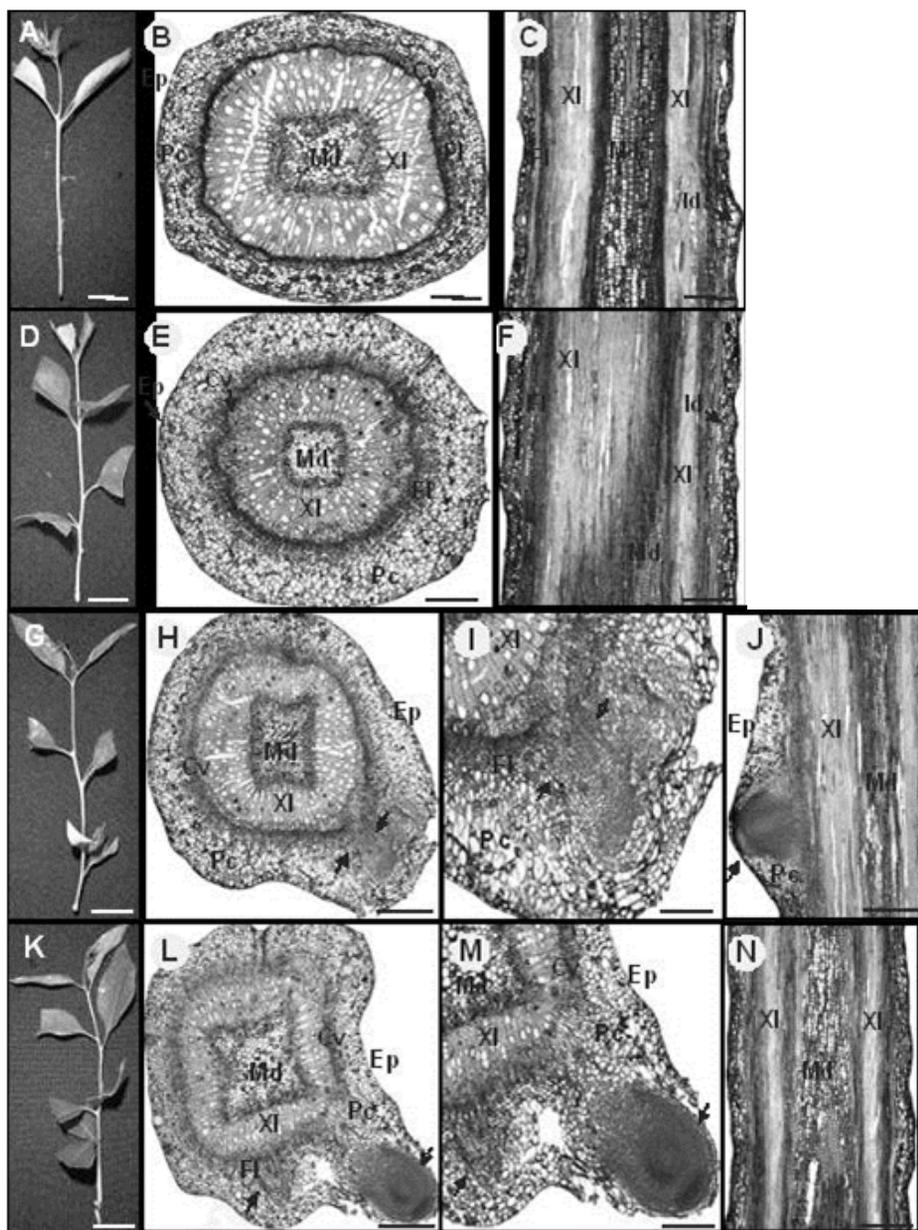


FIGURA 3: Miniestacas e micrografias de cortes histológicos na base de miniestacas do clone H2 aos 6 (A, B e C); 8 (D, E e F); 10 (G, H, I e J); e 12 (K, L, M e N) dias após o plantio em substrato. B, R, H, I, L e M: cortes transversais. C, F, J e N: cortes longitudinais. I e M: detalhes do corte transversal da miniestaca mostrando o desenvolvimento e a formação endógena do primórdio radicular a partir do câmbio vascular (Cv). Id = idioblastos com óleo; Ep = epiderme; Fl = floema secundário; Md = medula; Pc = parênquima cortical; Xl = xilema secundário. Barras: A, D, G e K = 10 mm; B = 37 μ m; C = 43 μ m; E = 38 μ m; F = 64 μ m; H = 54 μ m; I = 23 μ m; J = 81 μ m; L = 54 μ m; M = 40 μ m; N = 81 μ m.

FIGURE 3: Mini-cuttings and micrographies of histological sections in mini-cuttings of the clone H2 at 6 (A, B and C); 8 (D, E and F); 10 (G, H, I and J); and 12 (K, L, M and N) days after planting in substrate. B, R, H, I, L and M: cross sections; C, F, J and N: longitudinal sections. I and M: details of transversal sections showing the development and the endogenous origin of the root primordium from vascular cambium (Cv). Id = idioblasts containing oil; Ep = epidermis; Fl = secondary phloem; Md = pith; Pc = cortical parenchyma; Xl = secondary xylem. Bars = A, D, G and K = 10 mm; B = 37 μ m; C = 43 μ m; E = 38 μ m; F = 64 μ m; H = 54 μ m; I = 23 μ m; J = 81 μ m; L = 54 μ m; M = 40 μ m; N = 81 μ m.

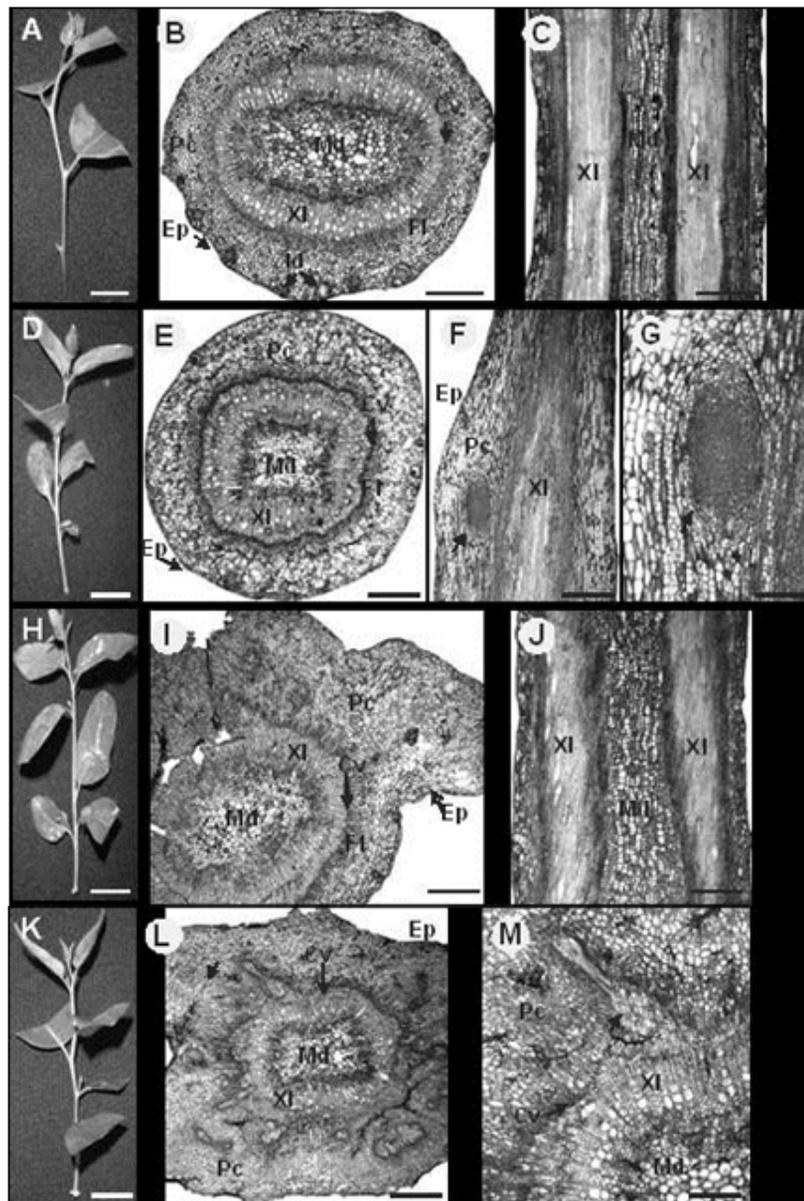


FIGURA 4: Miniestacas e micrografias de cortes histológicos na base de miniestacas do clone H3 aos 6 (A, B e C); 8 (D, E, F e G); 10 (H, I, e J); e 12 (K, L e M) dias após o plantio em substrato. B, E, I, L e M: cortes transversais. C, F, G e J: cortes longitudinais. F e G: detalhes do corte longitudinal da miniestaca mostrando um primórdio radicular seccionado transversalmente. I, L e M: detalhe do corte transversal da miniestaca mostrando a proliferação e a formação de uma massa de células desorganizadas (calos) próximo ao câmbio vascular (Cv). Id = idioblastos com óleo; Ep = epiderme; Fl = floema secundário; Md = medula; Pc = parênquima cortical; Xl = xilema secundário. Barras: A, D, H e K = 10 mm; B = 31 μ m; C = 50 μ m; E = 37 μ m; F = 81 μ m; G = 26 μ m; I = 46 μ m; J = 53 μ m; L = 55 μ m; M = 29 μ m.

FIGURE 4: Mini-cuttings and micrographies of histological sections of the clone H3 mini-cutting harvested at 6 (A, B and C); 8 (D, E, F and G); 10 (H, I and J) and 12 (K, L and M) days after planting in substrate. B, E, I, L and M: cross sections; and C, F, G and J: longitudinal sections. F and G: details of a longisection showing a root primordium transversely sectioned. I, L and M: details of cross section displaying cellular proliferation and callus formation nearby vascular cambium (Cv). Id = idioblasts containing oil; Ep = epidermis; Fl = secondary phloem; Md = pith; Pc = cortical parenchyma; Xl = secondary xylem. Bars = A, D, H and K = 10 mm; B = 31 μ m; C = 50 μ m; E = 37 μ m; F = 81 μ m; G = 26 μ m; I = 46 μ m; J = 53 μ m; L = 55 μ m; M = 29 μ m.

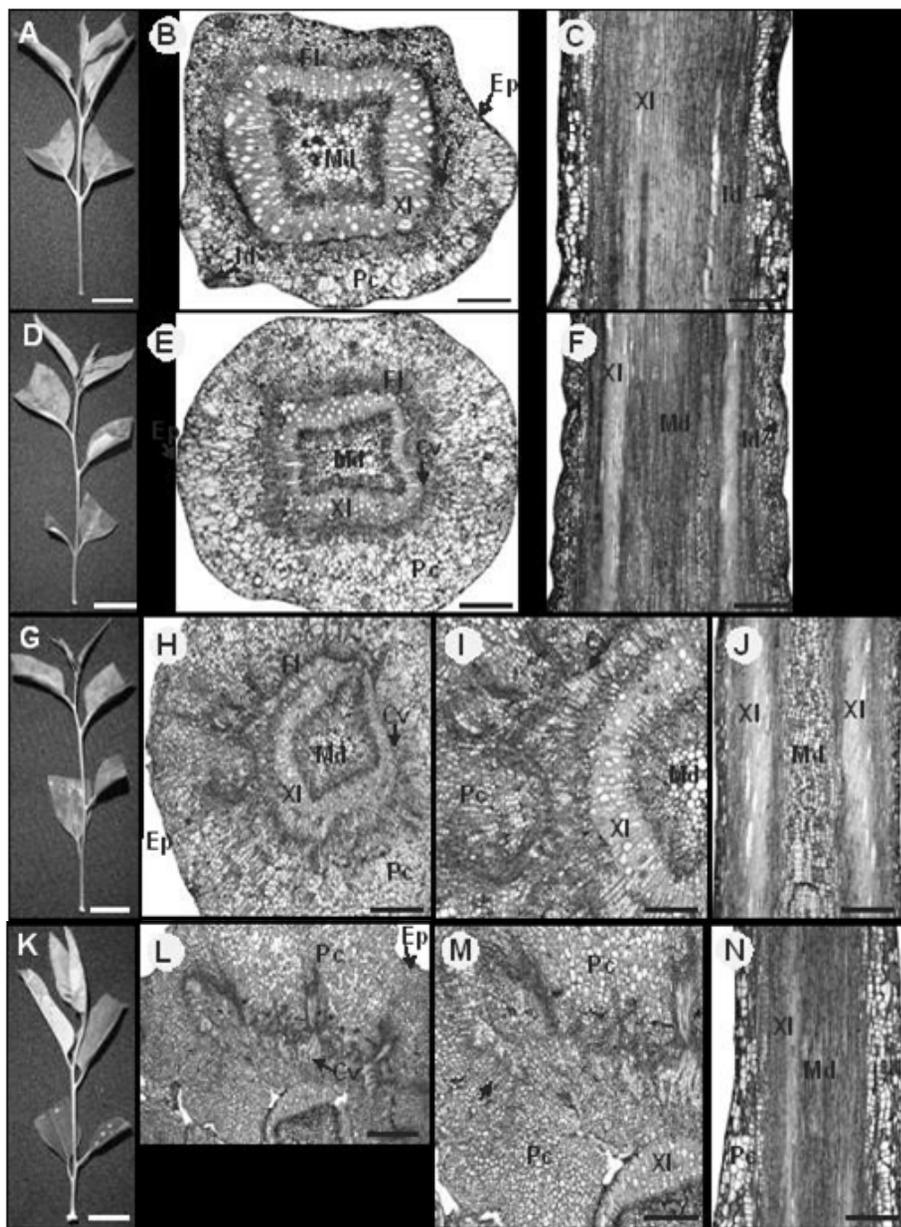


FIGURA 5: Miniestacas e micrografias de cortes histológicos na base de miniestacas do clone H4 aos 6 (A, B e C); 8 (D, E e F); 10 (G, H, I e J); e 12 (K, L, M e N) dias após o plantio em substrato. B, E, H, I, L e M: corte transversal. C, F, J e N: cortes longitudinais. L e M: detalhes do corte transversal da miniestaca mostrando a proliferação e a formação de calo nas proximidades do câmbio vascular (Cv) e floema secundário (Fl). Id = idioblastos com óleo; Ep = epiderme; Fl = floema secundário; Md = medula; Pc = parênquima cortical; Xl = xilema secundário. Barras: A, D, G e K = 10 mm; B = 37 μ m; C = 43 μ m; E = 45 μ m; F = 46 μ m; H = 55 μ m; I = 30 μ m; J = 81 μ m; L = 55 μ m; M = 58 μ m; N = 66 μ m.

FIGURE 5: Mini-cuttings and micrographies of histological sections of the clone H4 after mini-cutting harvested at 6 (A, B and C); 8 (D, E and F); 10 (G, H, I and J); and 12 (K, L, M and N) days after planting in substrate. B, E, H, I, L and M: cross sections; and C, F, J and N: longitudinal sections. L and M: detail of cross section displaying cellular proliferation and callus formation nearby cambium (Cv) and secondary phloem (Fl) regions. Id = idioblasts containing oil; Ep = epidermis; Fl = secondary phloem; Md = pith; Pc = cortical parenchyma; Xl = secondary xylem. Bars = A, D, G and K = 10 mm; B = 37 μ m; C = 43 μ m; E = 45 μ m; F = 46 μ m; H = 55 μ m; I = 30 μ m; J = 81 μ m; L = 55 μ m; M = 58 μ m; N = 66 μ m.

radiculares (contudo, esses tecidos mais tenros são sujeitos à maior perda de água e ao dessecamento, podendo contribuir para aumentar a mortalidade dos propágulos) e *ii*) às características intrínsecas ao material genético (FACHINELLO et al., 1995; HARTMANN et al., 2002). Goulart et al. (2008) avaliaram o comportamento rizogênico desses mesmos clones quanto à presença de concentrações de AIB ou ANA. Esses autores relataram que, na ausência de aplicações dessas auxinas sintéticas, percentuais de enraizamento das miniestacas na saída da casa de sombra (aos 35 dias de idade) ou na saída da casa de vegetação, foram superiores a 90%, exceção ao clone H4, que apresentou decréscimo na sobrevivência das miniestacas a pleno sol mesmo quando foram aplicados AIB e ANA. Logo, o clone H4 necessita de estudos mais aprofundados visto que apresentou maior dificuldade de enraizamento, confirmando os resultados obtidos por essa caracterização morfoanatômica.

CONCLUSÕES

A formação endógena de primórdios radiculares e a proliferação e massas de células desorganizadas (calos) das miniestacas dos quatro clones *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* avaliados foram observadas entre 8 e 12 dias de idade, a partir de células presentes na região do câmbio vascular.

AGRADECIMENTOS

À empresa International Paper do Brasil, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela disponibilização do material genético (clones) e pelo apoio financeiro, de pessoal e de infraestrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, A.; WAISEL, Y. Biology of root formation and development. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOLOGY OF ROOT FORMATION AND DEVELOPMENT, 2., 1996, Jerusalem. **Proceedings...** New York: Plenum, 1996. 376 p.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. et al. (Eds.) **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p.267-273.

ASSIS, T.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTERS, C.; CARSON, M.

(Eds.). **Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century**, Research Signpost, India, 2004. p. 303-333.

BALTIERRA, X. C.; MONTENEGRO, G.; GARCÍA, E. Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globulus*. **Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 499-503, 2004.

BEYL, C.; TRIGIANO, R.N. **Plant propagation concepts and laboratory exercises**. London: CRC Press, 2008. 480 p.

BRONDANI, G. E. **Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii***. 2012. 184 f. Tese (Doutorado) – ESALQ, Piracicaba, 2012.

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPel, 1995. 179 p.

GENEVE, R. L. Patterns of adventitious root formation in English Ivy. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 10, p. 216-220, 1991.

GINZBURG, C. Organization of the adventitious root apex in *Tamarixaphylla*. **American Journal of Botany**, v. 54, p. 4-8, 1967.

GOULART, P. B.; XAVIER, A.; CARDOSO, N. Z. Efeito dos reguladores de crescimento AIB e ANA no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Revista Árvore**, v. 32, p. 1051-1058, 2008.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 423 p.

LI, S. W. et al. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, New York, v. 75, n. 2, p. 230-247, 2009.

MEDRADO, M. S. J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; COSTA, J. D. Alterações anatômicas em estacas de seringueira (*Hevea brasiliensis* clone RRIM 600) em resposta a diferentes técnicas de indução de enraizamento. **Scientia Agrícola**, v. 52, n. 1, p. 89-95, 1995.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 215-249.

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

NORBERTO, P. M. **Efeitos da época de poda, cianamida hidrogenada, irrigação e ácido indolbutírico na colheita antecipada e**

- enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.).** 1999. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of structure principles and selected methods.** Melbourne: Termarcaphi Pty., 1981, 280 p.
- RASMUSSEN, A.; SMITH, T. E.; HUNT, M. A. Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus Elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings in different temperature environments. **New Forests**, Dordrecht, v. 38, n. 3, p. 285-294, 2009.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p
- XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus*.** Viçosa: SIF, 1998. 10 p. (Informativo Técnico SIF, 11).
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa: Ed. UFV, 2009. 272 p.
- ZHU, X. Y. et al. Induction and origin of adventitious roots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 101, n. 3, p. 287-294, 2010.