**USO DE ADITIVOS E COFATORES NA RIZOGÊNESE
DE PLÂNTULAS DE *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro***

CLÁUDIA CHIARINI MONTEIRO LIMA

Engenheira Florestal

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração: Ciências
Florestais.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Lima, Cláudia Chiarini Monteiro

Uso de aditivos e cofatores na rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill.
in vitro / Cláudia Chiarini Monteiro Lima. - Piracicaba, 1998.
99 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Enraizamento "in vitro" 2. Estimulante de crescimento vegetal 3. Eucalipto 4.
Plântula 5. Propagação "in vitro" 6. Regulador de crescimento I. Título

CDD 634.9734

**USO DE ADITIVOS E COFATORES NA RIZOGÊNESE DE
PLÂNTULAS DE *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro***

CLÁUDIA CHIARINI MONTEIRO LIMA

Aprovada em: 06/05/1998

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

ESALQ/USP

Prof^ª Dr^a BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES

CENA/USP

Prof. Dr. MARCÍLIO DE ALMEIDA

ESALQ/USP

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Orientador

*A DEUS pelo simples
fato de eu existir;*

*Ao meu querido marido ROGÉRIO,
meu companheiro nesta maravilhosa vida,
pelo amor, carinho e compreensão nas
horas mais difíceis;*

*À MELISSA, minha querida filha,
pelo simples fato de sua existência;*

Ao futuro baby que está a caminho;

*Aos meus queridos pais
AILTON e MARIA EUDULIA,
a quem lhes devo tudo,
pela constante ajuda e carinho;*

*Aos meus queridos irmãos:
RENATA, FERNANDO e ANDRÉ,
pelo carinho e apoio;*

*Aos meus queridos avôs
(in memorian);
Às minhas queridas avós:
Maria, Florisbela e Perpétua;*

*Aos meus queridos tios e tias,
especialmente à tia Cida e Melinda;*

*Aos meus queridos
cunhados e cunhadas,
sobrinhos e sobrinhas;*

*Especialmente ao Ricardo
(in memorian).*

AGRADECIMENTOS

Ao professor. Dr. Antonio Natal Gonçalves, pela orientação e estímulo durante este trabalho e especialmente pelo apoio e compreensão recebidos nas fases mais difíceis;

Aos professores do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, pelos ensinamentos recebidos;

Aos professores Dr^a. Adriana Martinelli Rodrigues, Dr^a. Beatriz Madalena Januzzi Mendes e Dr. Marcílio de Almeida, pelas sugestões oferecidas neste trabalho;

Ao professor Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto pela orientação na análise estatística e sugestões;

Ao professor Dr. Marcelo Côrrea Alves (Ciagri) pela orientação na análise estatística;

Ao técnico do Laboratório de Fisiologia das Árvores José Roberto Romanini, pelos ensinamentos, apoio e principalmente pela amizade;

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos durante a realização do Curso de Pós-Graduação;

Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais, Biblioteca do IPEF e Biblioteca Central;

A minha querida irmã Renata, pela valiosa ajuda na revisão deste trabalho;

A todos os colegas do CPG em Ciências Florestais da ESALQ/USP;

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia das Árvores, pelo convívio e amizade, especialmente à Sandra e Yurika e Lúcia;

Às queridas amigas Ariane, Mônica e Vera, pelo convívio e amizade durante a minha formação;

Especialmente, a minha querida amiga e companheira Márcia, que muito me apoiou nos momentos mais difíceis, na ajuda e convívio constantes durante todas as fases deste trabalho, e também nas fases mais alegres de todo esse período.

A todos que de alguma forma me apoiaram durante o transcorrer desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
RESUMO	xx
SUMMARY	xxii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Micropropagação do <i>Eucalyptus</i>	2
2.2 Enraizamento	4
2.2.1 Auxinas.....	4
2.2.2 Citocininas	8
2.2.3 Auxinas e compostos fenólicos.....	9
2.2.4 Aminoácidos	16
2.3 Modelo teórico de algumas classes de produtos secundários.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Material vegetal	21
3.2 Desinfestação das sementes	21
3.3 Obtenção dos explantes.....	21
3.4 Experimento 1.....	22
3.5 Experimento 2.....	25
3.6 Experimento 3.....	26
3.7 Experimento 4.....	26
3.8 Experimento 5.....	26
3.9 Experimento 6.....	26

3.10 Experimento 7	27
3.11 Experimento 8	27
3.12 Delineamento Estatístico	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Uso de fenóis	28
4.1.1 Experimento 1	28
4.1.2 Experimento 2	36
4.1.3 Experimento 3	42
4.1.4 Experimento 4	48
4.1.5 Experimento 5	56
4.2 Uso de aminoácidos	63
4.2.1 Experimento 6	63
4.2.2 Experimento 7	70
4.2.3 Experimento 8	79
4.3 Comparação entre os diversos experimentos e tratamentos	85
5 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE	98

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a interação floroglucinol x AIB.....	29
2 Efeito do floroglucinol sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.....	31
3 Efeito do AIB sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.....	32
4 Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação floroglucinol x AIB, aos 20 dias de cultivo	33
5 Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação floroglucinol x AIB, aos 20 dias de cultivo	33
6 Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação floroglucinol x AIB, aos 20 dias de cultivo.....	34
7 Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para o floroglucinol e AIB	35
8 Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a interação ácido cafeico x AIB	36

9	Efeito do ácido cafeico sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	38
10	Efeito do AIB sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.....	39
11	Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação ácido cafeico x AIB, aos 20 dias de cultivo	40
12	Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação ácido cafeico x AIB, aos 20 dias de cultivo	40
13	Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação ácido cafeico x AIB, aos 20 dias de cultivo.....	41
14	Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para o ácido cafeico e AIB.....	41
15	Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a interação resorcina x AIB	42
16	Efeito da resorcina sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	44

17	Efeito do AIB sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.....	45
18	Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação resorcina x AIB, aos 20 dias de cultivo.....	46
19	Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação resorcina x AIB, aos 20 dias de cultivo.....	46
20	Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação resorcina x AIB, aos 20 dias de cultivo	47
21	Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a resorcina e AIB.....	47
22	Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a interação hidroquinona x AIB	48
23	Efeito da interação hidroquinona em função do AIB sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para a variável número de raízes (NUMR), aos 20 dias de cultivo.....	50
24	Efeito da interação AIB em função da hidroquinona sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para a variável número de raízes (NUMR), aos 20 dias de cultivo	51

25 Efeito da hidroquinona sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	52
26 Efeito do AIB sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	53
27 Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação hidroquinona x AIB, aos 20 dias de cultivo	54
28 Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação hidroquinona x AIB, aos 20 dias de cultivo	54
29 Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação hidroquinona x AIB, aos 20 dias de cultivo	55
30 Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a hidroquinona e AIB.....	55
31 Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a interação ácido clorogênico x AIB	56
32 Efeito do ácido clorogênico sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	58

33	Efeito do AIB sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.....	59
34	Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação ácido clorogênico x AIB, aos 20 dias de cultivo	60
35	Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação ácido clorogênico x AIB, aos 20 dias de cultivo	61
36	Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação ácido clorogênico x AIB, aos 20 dias de cultivo	61
37	Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para o ácido clorogênico e AIB.....	62
38	Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a interação fenilalanina x AIB	63
39	Efeito da fenilalanina sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	65
40	Efeito do AIB sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	66
41	Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação fenilalanina x AIB, aos 20 dias de cultivo	67

42	Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação fenilalanina x AIB, aos 20 dias de cultivo	68
43	Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação fenilalanina x AIB, aos 20 dias de cultivo	68
44	Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , os 20 dias de cultivo, para a fenilalanina e AIB.....	69
45	Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a interação prolina x AIB.....	70
46	Efeito da interação prolina em função de AIB, para a variável número de raízes (NUMR), aos 20 dias de cultivo	72
47	Efeito da interação AIB em função da prolina, para a variável número de raízes (NUMR), aos 20 dias de cultivo	73
48	Efeito da prolina sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	74
49	Efeito do AIB sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.....	75
50	Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação prolina x AIB, aos 20 dias de cultivo	76

51 Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação prolina x AIB, aos 20 dias de cultivo	76
52 Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação prolina x AIB, aos 20 dias de cultivo	77
53 Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a prolina e AIB	78
54 Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para a interação triptofano x AIB	79
55 Efeito do triptofano sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	81
56 Efeito do AIB sobre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo	82
57 Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação triptofano x AIB, aos 20 dias de cultivo.	83
58 Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação triptofano x AIB, aos 20 dias de cultivo	83
59 Comparação dos valores méios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação triptofano x AIB, aos 20 dias de cultivo	84

60 Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para o triptofano e AIB.....	84
61 Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para todos os experimentos	85
62 Porcentagem de enraizamento das plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para todos os tratamentos	86
63 Valores médios do número de raízes de plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo	86
64 Valores médios de plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> , aos 20 dias de cultivo, para as variáveis comprimento de raiz e comprimento da parte aérea.....	87

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Número de plantas micropropagadas de <i>Eucalyptus</i> spp. existentes em campo e localizadas em vários Estados do Brasil	3
2 Doses (μM) de floroglucinol em combinação com doses de AIB e seus respectivos tratamentos.....	23
3 Classe de tamanho para o comprimento da raiz para o experimento 1	24
4 Classe de tamanho para o comprimento da parte aérea	24
5 Doses (μM) dos produtos ácido cafeico, resorcina, hidroquinona, ácido clorogênico, fenilalanina, prolina e triptofano, em combinação com doses de AIB e seus respectivos tratamentos	25
6 Classe de tamanho para o comprimento da raiz, para os experimentos 2 a 8.....	26
7 Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para o floroglucinol e AIB, aos 20 dias de cultivo.....	29
8 Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para o ácido cafeico e AIB, aos 20 dias de cultivo.....	37
9 Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para a resorcina e AIB, aos 20 dias de cultivo.....	43

10	Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para o hidroquinona e AIB, aos 20 dias de cultivo.....	49
11	Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para o ácido clorogênico e AIB, aos 20 dias de cultivo.....	57
12	Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para a fenilalanina e AIB, aos 20 dias de cultivo.....	64
13	Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para o prolina e AIB, aos 20 dias de cultivo.....	71
14	Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para o triptofano e AIB, aos 20 dias de cultivo.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA :	Ácido indolil-3-acético
AIB:	Ácido indol butírico
ANA:	Ácido naftaleno acético
CA:	Comprimento da parte aérea
CR:	Comprimento da raiz
MS:	Murashige & Skoog
NOA:	Ácido naftoxiacético
NUMR:	Número de raízes
%R:	Porcentagem de enraizamento

**USO DE ADITIVOS E COFADORES NA RIZOGÊNESE
DE PLÂNTULAS DE *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro***

Autora: CLÁUDIA CHIARINI MONTEIRO LIMA

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do uso de AIB e aditivos ou cofatores (fenóis e aminoácidos), na rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro*. Os explantes utilizados tinham aproximadamente 1,0 cm de comprimento e foram inoculados em número de 5 por frasco de cultura. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 20 dias. Para o experimento com floroglucinol, foram testadas todas as combinações entre o floroglucinol (0, 1000, 2000, 4000 μM) e AIB (0; 0,5; 1 e 2 μM); para os demais experimentos, foram testadas as combinações entre os aditivos ou cofatores nas concentrações (0, 1, 2 e 4 μM) com AIB (0; 0,5; 1 e 2 μM). Após 20 dias de cultivo, foram avaliados: a % de enraizamento, o número de raízes/plântula, o comprimento da raiz e o comprimento da parte aérea. Nos experimentos que utilizaram produtos fenólicos, ocorreu indução de enraizamento em maior número de plântulas do que nos experimentos que utilizaram aminoácidos. Na ausência do AIB, todos os experimentos apresentaram maior porcentagem de enraizamento. A aplicação de AIB em doses mais altas diminuiu a porcentagem de enraizamento das plântulas. Para a variável número de raízes, os valores médios mais altos foram obtidos para o ácido clorogênico e floroglucinol. Os valores médios mais

altos para a variável comprimento da raiz foram obtidos para o ácido cafeico e hidroquinona, enquanto que para a variável comprimento da parte aérea, tais valores foram obtidos para o ácido cafeico e ácido clorogênico.

**USE OF ADDITIVES AND COFACTORS ON THE RHYZOGENESIS
OF *Eucalyptus grandis* Hill. ex Maiden seedlings *in vitro***

Author: CLÁUDIA CHIARINI MONTEIRO LIMA

Advisor: ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effects of the use of IBA and additives or cofactors (phenolic compounds and aminoacids) on the rhyzogenesis of *Eucalyptus grandis* Hill. ex Maiden seedlings *in vitro*. The explants utilized had 1,0 cm of height and were obtained from seedlings produced *in vitro* with the roots cut. Thereafter, they were inoculated in number of five per culture flask. The cultures were kept in growth room at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a photophase of 16h for 20 days. For the phloroglucinol trial it was tested the concentrations of 0, 1000, 2000 e 4000 μM in combination with IBA at 0; 0,5; 1,0 e 2,0 μM . For the other trials the additives and cofactors were utilized only at 0, 1, 2 e 4 μM in combination with the IBA concentrations. The variables utilized to evaluate the trials were: rooting percentage, number of roots, root lenght and seedling height. The analyses of the results showed that: the phenolic compounds induced higher rooting percentage than the aminoacids; all treatments devoid of IBA showed higher rooting percentage; the higher IBA concentrations reduced the rooting percentage; chlorogenic acid and phloroglucinol gave higher number of roots, while longer roots were achieved by using cafeic acid and hydroquinone, with the higher plantlets being obtained by using cafeic and chlorogenic acids.

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas encontrados na micro e macropropagação, principalmente em relação às espécies lenhosas, é a fase de enraizamento.

A formação do primórdio de raiz adventícia em estacas de árvores adultas e de clones cultivados *in vitro*, seguida pelo desenvolvimento de raízes laterais, é importante para o sucesso da propagação de variedade selecionadas de muitas espécies importantes na horticultura e silvicultura.

Em muitas espécies de *Eucalyptus*, assim como em muitas outras espécies lenhosas, a dificuldade em obter níveis multiplicáveis de formação de raiz em estaca ou gemas cultivadas *in vitro* pode ser um sério obstáculo para a propagação de genótipos superiores (Blomstedt et al., 1991).

Assim, para se promover a rizogênese *in vitro*, tornam-se necessários ajustes dos componentes químicos e físicos do meio de cultura, pois a concentração efetiva de cada substância pode variar entre espécies e dentro de uma mesma espécie.

Deste modo, torna-se necessário o estudo da rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis*, através do uso de aditivos e cofatores (floroglucinol, ácido cafeico, resorcina, hidroquinona, ácido clorogênico, fenilalanina, prolina e triptofano) no meio de cultivo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do uso de AIB e aditivos ou cofatores na rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micropropagação do *Eucalyptus*

Informações obtidas em 1993 mostram que existem mais de 746 mil árvores de *Eucalyptus* spp. originárias de micropropagação e plantadas em diferentes regiões do País (Tabela 1). Plantios monoclonais e testes clonais com plantas micropropagadas de *Eucalyptus* spp. vêm sendo instalados por algumas empresas do setor florestal do Brasil desde 1986 (Gonçalves, 1993¹, citado por Correia, 1993).

A estaquia de ramos é freqüentemente utilizada na propagação vegetativa das plantas lenhosas. Através do desenvolvimento da técnica de micropropagação de plantas, ampliaram-se as perspectivas de obtenção de material de melhor qualidade agronômica, em qualquer época do ano, em espaço e tempo reduzidos e com o máximo aproveitamento do propágulo vegetal, às vezes escasso em coleções de germoplasma (Barbosa et al., 1992).

As maiores limitações da micropropagação do eucalipto e outras plantas lenhosas, são os problemas de esterilização do material proveniente de árvores desenvolvidas no campo e o enraizamento direto de partes aéreas *in vitro* (Dolcet-Sanjuan et al., 1990; Krieken et al., 1991).

¹ GONÇALVES, A.N. ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Ciências Florestais, Piracicaba. Comunicação pessoal, 1993.

Tabela 1. Número de plantas micropropagadas de *Eucalyptus* spp. existentes em campo e localizadas em vários Estados do Brasil.

Espécie/híbrido	Número de plantas	Localização (Estado)
<i>E. dunnii</i>	170	PR
<i>E. grandis</i>	84.407	RS,PR,SP,ES,MG,MS
<i>E. pellita</i>	576	MG
<i>E. saligna</i>	146.758	RS,PR,SP
<i>E. urophylla</i>	53.522	SP,MG
<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>	150.030	ES,MG,BA
<i>E. citriodora</i> x <i>E. torelliana</i>	33.340	ES,MG,BA
<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>	33.455	SP
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	163.361	SP,ES,MS
<i>E. pellita</i> x <i>E. grandis</i>	6	MG
<i>E. pellita</i> x <i>E. urophylla</i>	16	MG
<i>E. tereticornis</i> x <i>E. grandis</i>	30.352	RS
<i>E. torelliana</i> x <i>E. citriodora</i>	3	MG
<i>E. urophylla</i> x <i>E. alba</i>	17.103	RS
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	8.338	MG,ES,BA
<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>	8.429	MG,ES,BA
Outras espécies	16.900	PR,SP
Total	746.766	

BA-Bahia; MG-Minas Gerais; MS-Mato Grosso do Sul; ES-Espírito Santo; SP-São Paulo; PR-Paraná; RS-Rio Grande do Sul.

FONTES: Acesita Energética S.A.; Aracruz Florestal S.A.; Cenibra Florestal S.A.; Champion Papel e Celulose Ltda.; Duraflora; Klabin Fabricadora de Papel e Celulose S.A.; Riocell S.A. e Cia Suzano (Julho a Outubro/1993).

Para que a micropropagação tenha sucesso, há três etapas que precisam ser vencidas: (1) estabelecimento dos explantes primários em cultura; (2) desenvolvimento do meio de cultura adequado e condições que proporcionem altas taxas de multiplicação e (3) indução do enraizamento. Das três etapas, o enraizamento continua sendo o principal problema na propagação de espécies arbóreas *in vitro* (Vieitez et al., 1989).

2.2 Enraizamento

Segundo Damiano et al. (1992), o processo de rizogênese é usualmente dividido em três fases: indução, expressão e alongação da raiz. Muitos fatores podem afetar estas fases, como o tipo e dosagem de reguladores de crescimento, concentração de sais, fisiologia dos explantes e condições ambientais (temperatura, fotoperíodo). A rizogênese também está correlacionada à razão citocinina/auxina e à presença de compostos orgânicos, em particular os fenóis.

2.2.1 Auxinas

O efeito das auxinas sobre o enraizamento não é devido meramente à sua ação sobre a distensão celular, mas ao estímulo que exerce sobre a divisão das células, fazendo com que grupos delas se desdiferenciem, voltem ao estado embrionário e originem novas raízes (Bandel, 1979).

Segundo Válio (1985), as auxinas são sintetizadas nas plantas em regiões de crescimento ativo, como o meristema apical, as gemas axilares, as folhas jovens e os meristemas das raízes, sendo translocadas para diferentes órgãos, onde atuam no mecanismo interno que controla o crescimento, muito pouco conhecido. As raízes são extremamente sensíveis às auxinas.

Além do AIA, naturalmente sintetizado pelas plantas, há numerosas outras auxinas de origem sintética, as quais agem de maneira semelhante ao AIA, embora não ocorram naturalmente nas plantas. Entre estas últimas podemos citar, por exemplo, o 2,4 - ácido dicloro-fenoxiacético (2,4-D), o ácido naftaleno-acético (ANA) e o ácido naftoxiacético (NOA) (Bandel, 1979).

Segundo Válio (1985), quando se aplica auxina a órgãos isolados, ocorre um aumento de resposta paralelo ao aumento da concentração até certo máximo, após o qual ocorre um efeito inibitório. Este efeito inibitório, no entanto, varia de tecido para tecido, sendo que, nas raízes, concentrações muito baixas, ineficazes em gemas ou caules, já apresentam um efeito inibitório. A resposta da planta à auxina endógena ou aplicada é, portanto, dependente tanto da natureza do tecido, como da concentração da substância presente (Galston & Davies, 1972).

A propagação clonal *in vitro* de espécies lenhosas tem sido muitas vezes difícil, porque muitas espécies não produzem prontamente raízes adventícias. O método de maior sucesso para a indução de raízes adventícias em espécies lenhosas tem sido as aplicações exógenas de auxinas sintéticas (ANA, AIB) em estacas e culturas de gemas *in vitro* (Alvarez & Nissen, 1989).

Sriskandarajah & Mullins (1981), trabalhando com a micropropagação da maçã Granny Smith e os fatores que afetam a formação de raízes *in vitro*, testaram três auxinas diferentes: AIB, NOA e 2,4-D. O 2,4-D foi inibitório para o enraizamento, mesmo em baixa concentração ($< 10 \mu\text{M}$). NOA e AIB promoveram efetivamente a formação de raízes e 59% - 65% das estacas formaram raízes, quando as culturas continham também NOA ou AIB a $10 \mu\text{M}$. Em altas concentrações as estacas produziram poucas raízes, mas muito calo branco e macio.

Segundo Bennett et al. (1994), gemas de *Eucalyptus globulus*, transferidas de um meio de multiplicação contendo BAP e colocadas em meio de enraizamento com $10 \mu\text{M}$ de ácido indol butírico (AIB), produziram poucas raízes e, muitas vezes, morreram enquanto estavam nesse meio. Em contraste, gemas de um meio de multiplicação contendo cinetina produziram mais raízes e permaneceram saudáveis durante o período no meio de enraizamento.

Em *Eucalyptus* spp., uma fase de pré-enraizamento, envolvendo quatro semanas em um meio contendo cinetina ou zeatina, foi necessária para evitar o efeito inibitório do BA na indução de raiz (Damiano et al., 1989).

Jones et al. (1994) trabalhou com explantes nodais de três clones de híbridos de *Eucalyptus*. Estes explantes foram multiplicados com sucesso em meio MS contendo 0,2 mg.L⁻¹ de BAP e 0,01 mg.L⁻¹ de ANA. O alongamento das gemas foi obtido em um meio similar contendo 0,2 mg.L⁻¹ de cinetina e a formação de raiz foi estimulada por 0,1 - 2,0 mg.L⁻¹ de AIB. No entanto, a produção de plântulas foi baixa e esporádica. A introdução de 1 % de carvão ativado e a omissão de reguladores de crescimento de plantas no meio de cultura melhorou tanto a elongação, como o enraizamento das plantas.

Rao (1988) conseguiu a indução de enraizamento de gemas de *Eucalyptus tereticornis* no escuro, trabalhando com uma seqüência de meios de cultura: metade da concentração do meio líquido MS com 4,9 µM de AIB, 5,5 µM de AIA e 5,3 µM de ANA por 4 dias, metade da concentração do meio MS semi-sólido, sem reguladores de crescimento, com carvão e meio MS líquido sem carvão ou reguladores de crescimento. De acordo com o autor, este sistema é adequado para a propagação massal dessa espécie, de difícil enraizamento.

De acordo com Curir et al. (1990), microestacas de *Eucalyptus gumii*, obtidas *in vitro* através da estimulação de gemas axilares, mostraram diferentes respostas de enraizamento no mesmo meio de enraizamento, em função do estado fisiológico induzido por citocininas em meios de multiplicação anteriormente utilizados. Cinetina e zeatina induziram um estado fisiológico caracterizado pela alta sensibilidade das microestacas ao estímulo de enraizamento exercido pelo AIB, mas o BAP não produziu o mesmo efeito. O estado fisiológico anterior foi caracterizado pelo aumento no acúmulo de dois flavonóides endógenos (identificados como quercetina glicosídeos), os quais podem ser

marcadores de um estado fisiológico bem definido. Eles poderiam ter alguma influência nos processos de enraizamento dos explantes cultivados *in vitro*.

Explantes de plântulas de 8 dias de idade de *Eucalyptus globulus globulus* foram estudados, para avaliar o efeito da auxina em induzir a diferenciação de primórdio radicular e seu subsequente desenvolvimento em raízes. Hipocótilos desinfestados ou explantes de raiz foram cultivados a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ em meio modificado de MS, contendo 2 % de sacarose e várias combinações de auxina e/ou citocinina. Das auxinas examinadas, o AIB nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} M foi mais efetivo na indução do primórdio radicular e conduziu a um aumento significativo na densidade do primórdio radicular, quando comparado com a testemunha tratada sem a auxina (Pelosi et al., 1995).

Das et al. (1990), trabalhando com a micropropagação de *Eucalyptus tereticornis*, conseguiu o melhor enraizamento utilizando o meio Knop's, contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB. O fator chave na indução de raiz foi a incubação no escuro por um período curto. A porcentagem de gemas que enraizaram e a sobrevivência das gemas enraizadas foi 60-80 %.

A oxidação biológica do AIA é um possível mecanismo para a regulação de sua concentração e, conseqüentemente, sua atividade no crescimento e diferenciação em plantas (Sabater et al. 1983).

De acordo com Galston & Davies (1972), a auxina provém, presumivelmente, dos ápices dos caules e move-se para baixo, segundo o mecanismo de transporte polar. Nas raízes, é provavelmente destruída, pois estas são extremamente sensíveis à substância e possuem níveis muito altos da enzima peroxidase, inativadora do AIA.

Para Bleasdale (1977), pedaços de caule sem folhas ou gemas não enraizam prontamente e freqüentemente nem chegam a formar raízes. Com essa observação,

chegou-se à conclusão de que gemas ativas ou folhas jovens acima da região do corte suprem, de algum modo, algo que estimula o desenvolvimento das raízes. O AIA estimula o enraizamento e concluiu-se que esse hormônio natural coordena o processo. O ANA e o AIB (auxinas sintéticas) produzem efeitos semelhantes e algumas plantas parecem exigir algumas substâncias em adição à auxina natural ou sintética para enraizar; entre esses vegetais, incluem-se muitas coníferas, *Hibiscus* sp e *Phaseolus aureus*.

As auxinas são amplamente utilizadas em trabalhos de micropropagação e são incorporadas aos nutrientes do meio de cultura para promover o desenvolvimento de calos, suspensão de células, ou órgãos (tais como meristemas, gemas ou extremidades de raízes) e para regular a morfogênese, especialmente em conjunção com as citocininas (George & Sherrington, 1984).

2.2.2 Citocininas

Segundo Yui (1990), o estímulo ao crescimento e diferenciação, através da divisão e alongamento celular, é maior quando utiliza-se uma combinação entre auxina e citocinina, que atua no controle da morfogênese e na formação de órgãos em cultura de tecidos.

De acordo com George & Sherrington (1984), o equilíbrio entre os reguladores de crescimento, auxina e citocinina, é freqüentemente necessário para a formação de gema adventícia e meristemas de raiz. As concentrações necessárias para cada tipo de regulador diferem bastante de acordo com o tipo de planta cultivada, as condições culturais e os compostos utilizados (George & Sherrington, 1984).

Em geral, as citocininas parecem ser inibidoras da iniciação e alongamento do eixo principal das raízes; a circunferência, entretanto, é geralmente ampliada devido à promoção da atividade do câmbio da raiz (Metivier, 1985).

Desde que o enraizamento é inibido por citocininas, elas podem ser consideradas inibidoras endógenas para a formação de raízes, como discutido por Bollmark et al. (1988)², citados por Bollmark & Eliasson (1990). Presumivelmente, o conteúdo endógeno deve diminuir abaixo de um certo nível inicial no hipocótilo, antes que a formação de raízes possa ocorrer. De acordo com esta hipótese, o conteúdo endógeno da citocinina, no dia do estaqueamento, deve ter tido um marcante efeito no subsequente enraizamento, para diminuir abaixo do nível inicial inibitório, devendo ser dependente do conteúdo inicial.

Segundo Bollmark & Eliasson (1990), a formação do primórdio de raiz em tecidos de plantas é geralmente promovida por auxinas e inibida por citocininas, quando estes hormônios são supridos exogenamente. Pouco se conhece sobre os efeitos da citocinina endógena em formação de raízes.

Os resultados inesperados com coníferas micropropagadas, mostrando avançada maturação, podem hipoteticamente ser explicados pelo fato de que os sistemas de raízes de plantas micropropagadas são pobremente desenvolvidos, quando comparados àqueles de mudas *in vivo*. Desde que sistemas de raízes de mudas produzam citocininas, possivelmente causando rejuvenescimento ou revigoramento, a falta de raízes (citocininas) nas plantas micropropagadas podem induzir maturação precoce (D. G. Thompson, comunicação pessoal, citado por Pierik, 1990).

2.2.3 Auxinas e compostos fenólicos

Os compostos fenólicos mais utilizados em cultura de tecidos são: floroglucinol, ácido cafeico, ácido florético, catecol, ácido clorogênico, entre outros.

² BOLLMARK, M.; KUBÁT, B.; ELIASSON, L. Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. **J. Plant Physiology**, v.132, p.262-265, 1988.

A habilidade dos tecidos das plantas para a formação de raízes adventícias depende da interação entre diferentes fatores endógenos e exógenos. Dentre estes, destacam-se as auxinas e alguns compostos fenólicos. Cofatores específicos também são produzidos em folhas jovens e gemas, sendo translocados para regiões de enraizamento, onde, juntamente com as auxinas e polifenoloxidasas, aumentam o complexo que estimula a iniciação radicular (Németh, 1981).

Segundo Wilson & Van Staden (1990), extratos de plantas individualizados e diversas substâncias endógenas e exógenas conhecidas têm promovido ou inibido o enraizamento adventício de estacas. Alguns dos promotores agem de acordo com a auxina (cofatora) e, entre estes, incluem vários fenóis. O modo de ação da maioria dos promotores e inibidores de enraizamento é obscuro. Não há uma boa evidência de que a rizocalina, o hormônio originalmente proposto para a formação de raízes, consiste de um conjugado auxina-fenol; outras explicações para a ação dos fenóis não são bem confirmadas. Sugere-se que a ação de muitos promotores e inibidores de enraizamento ocorra mediante injúria química. Sem restrição de suas identidades químicas, concentrações subletais promovem enraizamento, enquanto concentrações altas são inibitórias.

Efeitos positivos de compostos fenólicos no enraizamento *in vitro* se devem à inibição, pelos mesmos, da AIA-oxidase, prevenindo assim a destruição da auxina (Mattos, 1982).

O floroglucinol provavelmente aumenta o enraizamento, pela influência no metabolismo de auxina, ou, alternativamente, pela manutenção do potencial redox do tecido em seu estado reduzido (Wilson & Van Staden, 1990).

De acordo com Jones & Hatfield (1976), os compostos fenólicos não afetaram o número de raízes nas gemas de maçã cultivadas *in vitro*. O floroglucinol e o ácido

florético aumentaram notadamente o número de brotos que enraizaram com auxinas, enquanto que o ácido cafeico, pirogalol e catecol não foram efetivos nesta circunstância. Ao lado da iniciação de raízes, em resposta a aplicações externas do floroglucinol e ácido florético, considerações também podem ser dadas para a produção endógena destas substâncias. Elas parecem surgir em árvores de maçã pela degradação enzimática do floridizin, e a extensão dessa degradação e os níveis subsequentes dos produtos podem, deste modo, ser fatores endógenos importantes com respeito à habilidade dos brotos de maçã em produzirem raízes adventícias.

Caboni et al. (1992), trabalhando com estacas de maçã variedade M9 Jork, obtiveram bons resultados com a adição de 162 mg.L^{-1} de floroglucinol durante a fase de enraizamento, a qual mostrou um efeito sinérgico com o AIB e aumentou a porcentagem de enraizamento, tanto no escuro como na luz. Utilizando-se uma dosagem alta, o efeito foi inibitório (1620 mg.L^{-1}). Eles sugerem que certos efeitos positivos do floroglucinol e outros fenóis, na ausência de auxinas exógenas, são devidos, provavelmente, ao aumento do nível de auxina endógena, ocasionado pela presença desses fenóis.

O floroglucinol (composto fenólico) é usado em combinação com auxinas. Para alguns cultivares de maçã não tem apresentado efeito sobre o enraizamento *in vitro*. Em outros casos, tem causado inibição do crescimento e morte dos tecidos. Aparentemente, surge em tecidos de macieira através da degradação enzimática do glicosídeo floridizin. A elevação do nível desse produto nos tecidos, através da degradação, parece estimular o processo de enraizamento (Mattos, 1982). Esse mesmo autor obteve maior porcentagem de enraizamento de brotações de macieira *in vitro*, mantidas inicialmente em meio com floroglucinol (162 mg.L^{-1}) e AIA (1 mg.L^{-1}) e, posteriormente, transferidas para meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com metade da concentração de sais e AIB a 1 mg.L^{-1} , sem floroglucinol.

Segundo Zimmerman & Broome (1981) não há evidência de que o floroglucinol seja essencial para o enraizamento *in vitro* de cultivares de macieira, pois, em um experimento utilizando aglomerados de gemas *in vitro*, obtidas a partir de estacas de maçã, crescendo em meio de cultura MS modificado, foi feita uma avaliação da habilidade de formação de raízes adventícias das estacas, na presença ou ausência de do floroglucinol, em combinação com várias concentrações de AIB. O floroglucinol não promoveu o enraizamento de algumas cultivares, teve um efeito pequeno ou inconsistente em outras e estimulou o enraizamento de estacas apenas para a cultivar “Spartan”. No entanto, o floroglucinol não aumentou o enraizamento dessa mesma cultivar acima daquele obtido em experimentos preliminares, sem o floroglucinol. A inclusão de AIB ao meio de cultura melhorou o enraizamento de todas as cultivares e este efeito foi bem maior do que o efeito do floroglucinol, exceto para a cultivar “Spartan”.

Zimmerman (1984) utilizou 1 mM de floroglucinol no meio de enraizamento de várias cultivares de maçã e concluiu que ele foi efetivo em estimular o enraizamento dessas cultivares, particularmente da cultivar “Delicious”.

O AIB e o floroglucinol são necessários para o primórdio de raiz da variedade de maçã M.9, mas a contínua presença desses produtos pode limitar o subsequente desenvolvimento das raízes, por promover continuamente divisões de células que induzem a formação de calos (James & Thurbon, 1979). Segundo os mesmos autores, houve um efeito sinérgico do AIB e floroglucinol no enraizamento da variedade de maçã M.9, quando as gemas foram transferidas para meio livre de hormônio, mas para James & Thurbon (1981b), há um pouco de dúvida que o floroglucinol, nas concentrações de 162 mg.L⁻¹ e acima, sinergize o AIB para a iniciação de raízes nessa mesma variedade de maçã.

Para James & Thurbon (1981b), os dados do experimento na propagação *in vitro* da variedade de maçã M.9 podem ser aperfeiçoados, se o floroglucinol estiver presente

durante as fases da iniciação do desenvolvimento de brotos e raízes. Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos essenciais que determinam a necessidade deste composto durante a regeneração de raiz estão sendo correntemente investigados.

Abdul Kader et al. (1992), também trabalhando com a propagação *in vitro* de maçã, compararam a resposta de três cultivares ao uso de citocinina e auxina. Adicionando-se 162 mg.L⁻¹ de floroglucinol ao meio de enraizamento, não houve nenhuma melhora do enraizamento. Eles comentam que as diferenças na habilidade de enraizamento *in vitro* podem, provavelmente, ser atribuídas a variação clonal do material vegetal utilizado. Para Lyrene (1981)³, citado por Huang et al. (1990), o simples processo de manutenção de culturas contínuas de gemas *in vitro*, freqüentemente causa um leve, mas significativo rejuvenescimento. A incidência da capacidade de enraizar de segmentos de talos e o vigor total das gemas aumenta vagarosamente durante as subculturas (Huang et al., 1990).¹

O uso do floroglucinol (162 mg.L⁻¹) no enraizamento *in vitro* de gemas de maçã M.9 aumentou significativamente ($P < 0,01$) o enraizamento para as subculturas 11 e 15, mas não teve efeito significativo para a subcultura 21 (Webster & Jones, 1989). Segundo Howard et al. (1989), o benefício do floroglucinol diminui com a subcultura, sustentando a idéia que a ação do composto fenólico está relacionada ao grau de rejuvenescimento das culturas.

Segundo Shawky et al. (1993), gemas de maçã M.26, cultivadas em meio com a suplementação de floroglucinol (162 mg.L⁻¹), não tiveram efeito significativo no enraizamento.

³ LYRENE, P.M. Juvenility and production of fast-rooting cuttings from blueberry shoot cultures. *Journal of American Society for Horticultural Science*, v.106, p.396-398, 1981.

De acordo com James & Thurbon (1981a), vários compostos fenólicos, nas concentrações de 10^{-3}M , foram avaliados como AIA sinergistas, durante a fase de iniciação da raiz de duas variedades de maçã. Dos fenóis simples, apenas o floroglucinol e a hidroquinona tiveram algum efeito no número de raízes. O ácido clorogênico aumentou o número de raízes.

O catecol e o ácido clorogênico estimularam algum enraizamento de estacas de maçã, variedade M9 Jork, quando adicionados ao meio de enraizamento sem o AIB. Suas utilizações, juntamente com a auxina, têm um efeito inibitório no crescimento das raízes. Isto indica que esses fenóis não mostraram um efeito sinérgico com o AIB (Caboni et al., 1992).

Abreu et al. (1993), trabalhando com microestadas de *Eucalyptus citriodora* *in vitro*, utilizaram a combinação ácido clorogênico e AIB para avaliação do enraizamento. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se $45,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido clorogênico e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, mostrando uma maior porcentagem de enraizamento.

O trabalho de Berardi et al. (1993), com plântulas de *Pyrus calleryana*, mostra que o enraizamento *in vitro* foi promovido por auxinas, principalmente o ANA, enquanto o carvão ativado e o floroglucinol não tiveram efeito. Durante a aclimação o número de microestacas enraizadas aumentou, especialmente quando tratadas *in vitro* com AIB ou floroglucinol em combinação com alguma auxina.. Esses resultados sugerem o uso de floroglucinol e AIB para a indução de raiz *in vitro* e aclimação precoce das microestacas não enraizadas.

Rossi et al. (1992) não obtiveram nenhum aumento de enraizamento, utilizando oito diferentes doses de floroglucinol (0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280 mg.L^{-1}) na fase de enraizamento de *Pyrus calleryana* sel. D6.

O floroglucinol mostrou um efeito contraditório na formação *in vitro* de raízes de *Pyrus calleryana* entre genótipos e auxinas. Em concentrações altas de ANA, o floroglucinol aumentou o enraizamento de 5 para 20 % em média, enquanto nenhuma interação entre AIB e floroglucinol foi encontrada. O floroglucinol promoveu a formação de raízes no clone 11 em todas as concentrações de ANA, enquanto aumentou o enraizamento dos clones N, CH e D6, apenas quando combinado com 1 mg.L⁻¹ de ANA (Berardi et al., 1992).

Segundo Al-Maarri et al. (1994), a inclusão do floroglucinol (162 mg.L⁻¹) ao meio de enraizamento não aumentou a porcentagem de estacas enraizadas de plântulas de duas cultivares de *Pyrus communis*. Nenhuma diferença significativa foi observada, na presença ou ausência do floroglucinol, na porcentagem de estacas enraizadas entre os dois tratamentos (todos entre 80 e 88% de enraizamento).

Hammatt (1993), trabalhando com cereja (*Prunus padus* L.), conseguiu 45 % mais gemas com raízes em meio com floroglucinol, contra 21 % de gemas com raízes em meio sem floroglucinol.

O trabalho de Hammatt (1994) avalia a resposta do floroglucinol sobre as gemas de *Prunus avium* L., em meio de cultura sem auxina, antes e depois destas terem adquirido a habilidade de responder à auxina, durante o aparente rejuvenescimento. O floroglucinol aumentou a proporção de gemas que enraizaram, enquanto o ácido florético reduziu esta resposta, em meio com ou sem floroglucinol, e cancelou o efeito promotivo do floroglucinol. A concentração de floroglucinol também afetou significativamente o enraizamento em meio com ou sem auxina. A proporção de gemas enraizadas em meio contendo auxina, ou auxina mais floroglucinol, aumentou com o número de subculturas sucessivas, mas a proporção que enraizou apenas com o floroglucinol não foi afetada pelo número de subculturas. Antes que as gemas fossem sensibilizadas pela presença de

auxinas, 1 mM de floroglucinol foi mais efetivo que a auxina em induzir a formação de raiz.

RAO (1994) trabalhou com a regeneração de plântulas de gerânio (*Pelargonium graveolens*), em meio de cultura líquido e sólido, utilizando no meio de enraizamento 0,5, 1, 2, 5 e 10 μM de AIB e floroglucinol. A adição de 0,5 μM de AIB aumentou significativamente o enraizamento das plântulas, acima da média do controle (sem AIB e floroglucinol). Nenhum efeito foi observado com 0,5 μM de floroglucinol. Um aumento significativo no enraizamento foi observado nos tratamentos com AIB e floroglucinol, quando a concentração foi dobrada de 0,5 para 1 μM . Tanto o AIB como o floroglucinol mostraram uma resposta significativa no enraizamento utilizando meio de cultura líquido, nas cinco concentrações testadas.

De acordo com Pereira et al. (1994), para a formação de raízes de Espinheira Santa *in vitro* foram necessários ANA + AIB (2 + 1 ou 5 + 5 mg.L^{-1}), floroglucinol (80 mg.L^{-1}) e ácido nicotínico.

Ótimos resultados de enraizamento para a *Rosa damascena* Mill. foram obtidos, utilizando-se um meio de cultura contendo 25 % de sais minerais MS, 0,1 mg.L^{-1} de ANA e 126 mg.L^{-1} de floroglucinol, na presença de luz (Kornova & Michailova, 1994).

2.2.4 Aminoácidos

Os resultados dos experimentos de vários autores indicam que alguns aminoácidos adicionados ao meio de cultura influenciam a organogênese (Orlikowska, 1992).

Kavi Kishor (1989) propôs que o aumento do metabolismo de aminoácidos aromáticos está ligado à iniciação de raiz e formação de gema em cultura de calos de tabaco.

Entre os 16 aminoácidos incluídos separadamente no meio de cultura para explantes de gema de *Torenia fournieri*, ácidos glutâmico e aspártico, alanina, glutamina, prolina, serina e arginina estimularam a rizogênese na presença de ANA (Kamada & Harada, 1979⁴, citados por Orlikowska, 1992).

De acordo com Orlikowska (1992), os ácidos aspártico e glutâmico, ornitina, triptofano e arginina aumentaram o número de raízes de uma variedade de maçã.

A prolina aumentou a porcentagem de gemas enraizadas e o número de raízes por gema enraizada em *Prunus avium* e *P. cerasus* (Druart (1986-1987)⁵, citado por Orlikowska (1992)).

Geralmente a fenilalanina é utilizada em meios de cultura para estimular o crescimento de calo. A adição de 10 mM de fenilalanina (aminoácido precursor de fenóis) ao meio de cultura, para indução de calo de cacau, aumentou levemente os níveis totais de fenóis, mas esse efeito não foi visto após a adição de 5 ou 30 mM de fenilalanina e na maioria dos tratamentos com fenilalanina, os calos tornaram-se marrons (Marziah et al. 1993). Segundo Sicha et al. (1991), a fenilalanina aumentou a produção de ácidos cinâmicos e cafeicos acima de 2,5 mmol.

⁴ KAMADA, H.; HARADA, H. Influence of several growth regulators and amino acids on *in vitro* organogenesis of *Torenia fournieri* Lind. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.27-36, 1979.

⁵ DRUART, Ph. Contribution a l'elaboration de techniques de production en masse *in vitro* d'especes ligneuses utilisables en culture fruitiere. Doctoral Thesis. Faculte des Sciences Agronomiques de l'Etat Gembloux, 1986-1987.

A prolina é utilizada, geralmente, em meios de cultura para indução de embriões somáticos, associada ou não à diferentes combinações de auxinas, como mostra o trabalho de Kim et al. (1994), com *Quercus acutissima*.

2.3 Modelo teórico de algumas classes de produtos secundários

Esquema geral da síntese de algumas classes de produtos secundários a partir de aminoácidos aromáticos em plantas superiores (Fonte: Poulsen & Verpoorte, 1991).

O trabalho de Poulsen & Verpoorte (1991) mostra que todas as plantas examinadas contêm a enzima corismato mutase regulada, a qual é inibida pela fenilalanina e tirosina. A enzima é ativada pelo triptofano, e a inibição causada pela fenilalanina e/ou tirosina é sempre reversível pela ativação do triptofano.

Preparados de plantas, que convertem o triptofano para ácido indolacético (AIA), caracteristicamente têm baixas reações de rendimentos. Desde que tais preparados, algumas vezes, também apresentem atividade da AIA-oxidase, a inibição da oxidase pode elevar os rendimentos do AIA (Gordon & Paleg, 1961).

Segundo Reinecke & Bandurski, (1990)⁶, citados por Caboni et al., (1992), enzimas tais como peroxidases, AIA-oxidase e polifenoloxidases estão incluídas no catabolismo do AIA e na oxidação de fenóis, os quais agem como cofatores ou inibidores de enraizamento. O efeito dos fenóis e outros cofatores depende da interação entre essas moléculas e as enzimas implicadas no metabolismo do AIA, durante o processo de enraizamento. Parece que os monofenóis e os metadifenóis ativam a AIA-oxidase e que os paradifenóis, orto-difenóis e polifenóis a inibem.

O trabalho de Gordon & Paleg (1961) mostra a atividade de vários mono e dihidroxi fenóis na conversão enzimática e não enzimática do triptofano para AIA. O catecol foi o único fenol testado que formou significantes quantidades de AIA, sem a participação enzimática.

Sistemas polifenol-oxidase têm sido relatados como causadores do desaparecimento do AIA. Desde que a polifenol oxidase leva à formação de quinonas a partir de fenóis, e quinonas são conhecidas por condensar em muitos casos com

⁶ REINECKE, D.M.; BANDURSKI, R.S. Auxin biosynthesis and metabolism. In: **Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development** (Davies PJ, ed) Kluwer Academic Publ, Dordrecht, 1990, p.24-42.

substâncias contendo nitrogênio, existe a possibilidade de que o AIA possa também formar uma condensação com quinonas. O experimento feito com fenóis ou misturas de AIA-fenol, mais a polifenol oxidase, sugere que o AIA forma alguns produtos adicionais com as quinonas, produzidas pela ação da polifenol oxidase sobre o catecol, ácido clorogênico ou ácido cafeico (Leopold & Plummer, 1961).

De acordo com Galston & Davies (1972), na planta, o AIA deriva do aminoácido triptofano, através de várias etapas enzimáticas, envolvendo desaminação oxidativa para formar indolpiruvato, decarboxilação para dar indolacetaldeído e, finalmente, oxidação do grupo aldeído terminal para formar AIA. Alternativamente, decarboxilação para triptamina pode ocorrer primeiro, seguida de desaminação oxidativa para formar indolacetaldeído e uma conversão similar à primeira para dar AIA. Há também na planta enzimas, incluindo peroxidases e fenoloxidases que, em condições apropriadas, podem destruir o AIA, formando produtos inativos como metilenooxiindol e indol 3-aldeído. Estas enzimas só agem, provavelmente, em condições em que a concentração de auxina atinge magnitude muito superior ao nível fisiológico usual. Ocorrem também reações de “desintoxicação”, em que o AIA é conjugado a vários materiais, tais como: ácido aspártico, inositol e D-glucose e reações de “sequestro”, envolvendo união do AIA com diversas macromoléculas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia das Árvores, do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ - USP), localizada no município de Piracicaba - SP, no período de Janeiro a Outubro de 1996.

3.1 Material vegetal

Como fonte de explantes foram utilizadas sementes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, originárias de Coff's Harbour. Estas sementes foram cedidas pela Chamflora Agrícola Ltda e pertencem à Área de Produção de Sementes.

3.2 Desinfestação das sementes

As sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), à 100% (V/V), sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, sob agitação constante. Após 20 minutos, estas sementes foram lavadas (3 a 4 vezes) com água deionizada esterilizada e inoculadas em meio de cultura básico de Gonçalves (1980) modificado e sem a adição de reguladores de crescimento, para a germinação das sementes.

3.3 Obtenção dos explantes

Após 20 dias de germinação, as plântulas, com tamanho ao redor de 1,0 cm, foram seccionadas, sob as mesmas condições assépticas, na base do hipocótilo (entre o

hipocótilo e a radícula), e a parte superior utilizada como explante. Os explantes foram inoculados no meio de cultura básico de Gonçalves (1980) modificado (Quadro 1 - Apêndice) suplementado com o AIB e o aditivo selecionado e com a adição de 30 g.L^{-1} de sacarose. e 5 g.L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado a 5,8 - 5,9.

Os frascos com meio de cultura foram autoclavados a $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 15 min, sobre pressão de $1,0 \text{ KG.cm}^{-2}$.

Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), por 20 dias.

Para a montagem dos experimentos, oito produtos químicos diferentes foram utilizados em combinação com o AIB: floroglucinol, ácido cafeico, resorcina, hidroquinona, fenilalanina, prolina, triptofano e ácido clorogênico.. Tais produtos foram escolhidos por pertencerem a diferentes grupos (fenóis e aminoácidos) e pela ação já conhecida de alguns deles, agindo como promotores ou inibidores de enraizamento. A concentração de AIB e dos aditivos e cofatores escolhidos para a instalação dos experimentos variou em função dos tratamentos.

Assim, foram conduzidos oito experimentos (cinco com fenóis e três com aminoácidos), abaixo relacionados.

3.4 Experimento 1. Efeito da combinação de doses de floroglucinol e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

Este experimento foi composto de 16 tratamentos, sendo 4 doses de floroglucinol e 4 doses de AIB (Tabela 2).

Tabela 2. Doses (μM) de floroglucinol em combinação com doses de AIB e seus respectivos tratamentos.

Tratamentos	floroglucinol (μM)	AIB
1	0	0,0
2	0	0,5
3	0	1,0
4	0	2,0
5	1000	0,0
6	1000	0,5
7	1000	1,0
8	1000	2,0
9	2000	0,0
10	2000	0,5
11	2000	1,0
12	2000	2,0
13	4000	0,0
14	4000	0,5
15	4000	1,0
16	4000	2,0

Cada tratamento foi constituído de 5 frascos de cultura, com 5 explantes cada, totalizando 25 amostras.

Considerou-se cada frasco uma repetição, totalizando 5 repetições por tratamento.

Após 20 dias de cultivo em meio de enraizamento, foram utilizados para a avaliação dos explantes os seguintes itens:

- porcentagem de enraizamento (%R): porcentagem de plântulas que apresentaram primórdio radicular.

- número de raízes por explante (NUMR): quantidade de raízes apresentada por cada plântula, mesmo esta sendo muito pequena.

- comprimento da raiz (CR) (considerou-se o comprimento da maior raiz): para tanto, adotou-se classes de tamanho, atribuindo-se uma nota para cada classe (Tabela 3).

Tabela 3. Classe de tamanho para o comprimento da raiz para o Experimento 1.

comprimento	nota raiz classe
$\geq 3,6$ cm	5
$\geq 2,6$ cm e $\leq 3,5$ cm	4
$\geq 1,6$ cm e $\leq 2,5$ cm	3
$\geq 1,1$ cm e $\leq 1,5$ cm	2
$\geq 0,1$ cm e $\leq 1,0$ cm	1
0,0 cm	0

- comprimento da parte aérea (CA) (comprimento da base do hipocótilo até o ápice do epicótilo): adotou-se também um critério de notas (Tabela 4).

Tabela 4. Classe de tamanho para o comprimento da parte aérea.

comprimento	nota da parte aérea classe
$\geq 1,9$ cm	3
$\geq 1,2$ cm e $\leq 1,8$ cm	2
$= 1,0$ cm $\pm 0,1$ cm	1

3.5 Experimento 2. Efeito da combinação de doses de ácido cafeico e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

Para este experimento e para os seguintes (3 a 8), adotou-se a mesma metodologia utilizada no experimento 1, reduzindo-se as doses dos produtos utilizados (exceto o AIB, onde manteve-se a mesma dosagem) para 0, 1, 2 e 4 μM (Tabela 5) e acrescentando-se mais uma nota para a avaliação do comprimento da raiz (Tabela 6).

Tabela 5. Doses (μM) dos produtos ácido cafeico, resorcina, hidroquinona, ácido clorogênico, fenilalanina, prolina e triptofano, em combinação com doses de AIB e seus respectivos tratamentos.

Tratamentos	PRODUTO	AIB
	(μM)	
1	0	0,0
2	0	0,5
3	0	1,0
4	0	2,0
5	1	0,0
6	1	0,5
7	1	1,0
8	1	2,0
9	2	0,0
10	2	0,5
11	2	1,0
12	2	2,0
13	4	0,0
14	4	0,5
15	4	1,0
16	4	2,0

Tabela 6. Classe de tamanho para o comprimento da raiz, para os experimentos 2 a 8.

comprimento	nota raiz classe
$\geq 3,6\text{cm}$	5
$\geq 2,6\text{cm e } \leq 3,5\text{cm}$	4
$\geq 1,6\text{ cm e } \leq 2,5\text{cm}$	3
$\geq 1,1\text{cm e } \leq 1,5\text{cm}$	2
$\geq 0,4\text{ cm e } \leq 1,0\text{ cm}$	1
$\geq 0,1\text{ cm e } \leq 0,3\text{ cm}$	0,5
0,0 cm	0

3.6 Experimento 3. Efeito da combinação de doses de resorcina e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

3.7 Experimento 4. Efeito da combinação de doses de hidroquinona e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

3.8 Experimento 5. Efeito da combinação de doses do ácido clorogênico e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

3.9 Experimento 6. Efeito da combinação de doses de fenilalanina e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

3.10 Experimento 7. Efeito da combinação de doses de prolina e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

3.11 Experimento 8. Efeito da combinação de doses de triptofano e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

3.12 Delineamento Estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4 para todos os experimentos.

Cada experimento foi composto de 16 tratamentos. Para cada tratamento foram utilizados 5 frascos, com 5 explantes cada, totalizando 25 amostras. Para a análise dos dados, considerou-se cada frasco uma repetição (efetuando-se uma média com os 5 explantes do frasco), totalizando 5 repetições por tratamento.

A análise dos dados foi feita através da análise da variância e do teste de Tukey, para as variáveis NUMR, CR e CA. Foi feita também uma análise de regressão para todos os experimentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Uso de fenóis

4.1.1 **Experimento 1.** Efeito da combinação de doses de floroglucinol e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

Na ausência da auxina exógena (Tratamentos 1, 5 e 13), o floroglucinol induziu o enraizamento em um maior número de plântulas (Figura 1 e 7). Já para Caboni et al. (1992), houve um aumento na porcentagem de enraizamento de estacas de maçã, com a adição de floroglucinol (162 mg.L^{-1}) e AIB ao meio de enraizamento, sendo que o floroglucinol mostrou um efeito sinérgico com o AIB.

A combinação de doses altas de floroglucinol e do AIB (Tratamentos 14, 15 e 16) diminuiu a porcentagem de enraizamento das plântulas. Caboni et al. (1992) também relataram um efeito inibitório no enraizamento de estacas de maçã, utilizando uma dosagem alta (1620 mg.L^{-1}) de floroglucinol.

Figura 1. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a interação floroglucinol x AIB.

Tabela 7. Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para o floroglucinol e AIB, aos 20 dias de cultivo.

DOSES	(µM)	NUMR	CR	CA
Floroglucinol	0	3,860 B	1,460 C	1,890 A
	1.000	4,450 A B	2,450 A	2,040 A
	2.000	4,780 A	1,990 B	1,860 A
	4.000	2,770 C	0,870 D	1,170 B
AIB	0	4,120 A	1,870 A	1,900 A
	0,5	3,740 A	1,910 A	1,680 A B
	1	3,600 A	1,580 A B	1,720 A B
	2	4,400 A	1,410 B	1,660 B
F		3,86 **	7,85 **	7,70 **
C.V. (%)		25,7	29,5	15,7
Média Geral		3,9650	1,6925	1,740

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Através da Tabela 7, nota-se que houve influência do floroglucinol sobre as três variáveis estudadas ($p < 0,01$), sendo que a dose 1000 μM proporcionou os melhores resultados para a variável CR, não diferindo da dose 2000 μM para a variável NUMR e das doses 0 e 2000 μM para a variável CA. Mattos (1982) obteve maior porcentagem de enraizamento de brotações de macieira *in vitro*, em meio inicial de enraizamento com 162 mg.L^{-1} de floroglucinol e 1 mg.L^{-1} de AIA. Webster & Jones (1989) também relataram um aumento significativo no enraizamento *in vitro* de gemas de maçã, utilizando-se 162 mg.L^{-1} de floroglucinol. Para Hammatt (1994), 1 mM (162 mg.L^{-1}) de floroglucinol foi mais efetivo que a auxina em induzir a formação de raiz em gemas de *Prunus avium* L.

A dose 4.000 μM de floroglucinol diferiu significativamente de todas as demais, apresentando os menores valores médios para as três variáveis, concordando com Caboni et al. (1992), onde uma dosagem alta foi inibitória no enraizamento de estacas de maçã.

O AIB influenciou o enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis* apenas para as variáveis CR ($p < 0,01$) e CA ($p < 0,05$), onde a dose 2 μM diferiu das doses de 0 e 0,5 μM para a variável CR e da dose 0 μM para a variável CA..

Através da Figura 2, observa-se que houve efeito do floroglucinol sobre o enraizamento, sendo que os modelos quadráticos mostram, para as três variáveis estudadas, que houve um aumento até a dose 1000 μM e, a partir da dose 2000 μM , ocorreu uma queda acentuada, indicando que as doses acima desse valor passaram a ter um efeito tóxico.

Assim, doses mais baixas de floroglucinol poderiam ser utilizadas, como nos demais experimentos, ou até a concentração 1000 μM , onde a curva de regressão mostrou um aumento crescente, principalmente para as variáveis NUMR e CR.

$$\text{NUMR: } y = 3.808 + 0.001124x - 0.000000345x^2 \quad R^2 = 0.3333 **$$

$$\text{CR: } y = 1.573 + 0.00828x - 0.000000253x^2 \quad R^2 = 0.4741 **$$

$$\text{CA: } y = 1.908 + 0.000174x - 0.00000009x^2 \quad R^2 = 0.5819 **$$

Figura 2. Efeito do floriglucinol sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

Para o AIB, os modelos lineares apresentados para as variáveis NUMR e CA não apresentaram diferença entre as doses, enquanto que para a variável CR, o modelo linear mostrou que a pior dose foi 2000 μM, indicando uma tendência à diminuição do CR com o aumento da dose de AIB (Figura 3).

$$\text{NUMR: } y = 3.808 + 0.1794x \quad R^2 = 0.0102 \text{ (NS)}$$

$$\text{CR: } y = 1.92 - 0.26x \quad R^2 = 0.0567 *$$

$$\text{CA: } y = 1.824 - 0.096x \quad R^2 = 0.0262 \text{ (NS)}$$

Figura 3. Efeito do AIB sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

Através das Figuras 4 e 5, observa-se que, para a variável NUMR, os melhores resultados foram proporcionados pelas doses 1000 e 2000 µM. Para a variável CR, o melhor resultado foi apresentado pela dose 1000µM (162 mg.L⁻¹). A adição de 1000 µM de floroglucinol no meio de enraizamento aumentou significativamente o enraizamento *in vitro* de gemas de maçã (Webster & Jones, (1989)).

A dose 4000 µM de floroglucinol conferiu aspecto endurecido às raízes e redução do número de pêlos absorventes. Caboni et al. (1992), trabalhando com estacas de maçã, observaram também um efeito inibitório com uma dosagem alta de floroglucinol.

Figura 4. Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação floroglucinol x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 5. Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação floroglucinol x AIB, aos 20 dias de cultivo.

A variável CA não apresentou diferença entre as doses de floroglucinol 0, 1000 e 2000 µM (Figura 6), sendo que a dose 4000 µM tornou as plântulas raquíticas.

Figura 6. Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação floroglucinol x AIB, aos 20 dias de cultivo.

O uso de floroglucinol proporcionou coloração alaranjada nas raízes (Figura 7).

A dose 4000 μM de floroglucinol, para as três variáveis estudadas, demonstrou ter um efeito inibitório, estando de acordo com Caboni et al. (1992) que relataram também um efeito inibitório no enraizamento de estacas de maçã, com uma dosagem alta de floroglucinol (Figuras 4, 5 e 6).

Houve um aumento pronunciado de calo nas folhas das plântulas, com o aumento da concentração de AIB e a combinação de doses altas de floroglucinol e AIB tornou as plântulas raquíticas, com muito calo nas folhas, clorose e toco de raízes, muitas vezes necróticos.

Figura 7. Plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para o floroglucinol e AIB.

4.1.2 Experimento 2. Efeito da combinação de doses de ácido cafeico e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

Através da figura abaixo, observa-se que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 1 e 2 μM de ácido cafeico. Na ausência deste, 0 a 0,5 μM de AIB induziram enraizamento em um maior número de plântulas (Figura 14).

Figura 8. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a interação ácido cafeico x AIB.

Tabela 8. Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA, para o ácido cafeico e AIB, aos 20 dias de cultivo.

DOSES	(μ M)	NUMR	CR	CA
Ácido cafeico	0	3,430 A	1,960 A	2,170 A B
	1	3,210 A	1,520 B	2,000 B
	2	3,700 A	2,080 A	2,310 A
	4	3,340 A	2,090 A	2,310 A
AIB	0	3,850 A	2,835 A	2,530 A
	0,5	3,210 A	1,660 B	2,150 B
	1	3,210 A	1,605 B	2,120 B
	2	3,410 A	1,550 B	1,990 B
F		0,98 ^(NS)	3,18 **	3,26 **
C.V. (%)		24,22	37,3	13,81
Média Geral		3,4200	1,9125	2,1975

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Pela tabela 8, observa-se que o ácido cafeico influenciou o comprimento da raiz ($p < 0,05$) e o comprimento da parte aérea ($p < 0,01$), sendo que as doses que proporcionaram melhores resultados médios foram as doses 2 e 4 μ M (Figura 14).

Houve influência do AIB sobre o enraizamento das plântulas apenas para as variáveis CR e CA ($p < 0,01$), onde na ausência da auxina foram obtidos os melhores resultados (Figura 14). Caboni et al. (1992) também relataram que os fenóis ácido clorogênico e catecol estimularam o enraizamento de estacas de maçã, quando adicionados ao meio de enraizamento sem o AIB. De acordo com esses autores, o uso de fenóis juntamente com a auxina, tem um efeito inibitório no crescimento de raízes.

Observa-se, pelos modelos lineares da Figura 9, que o ácido cafeico afetou o enraizamento das plântulas de *Eucalyptus* para as variáveis CR e CA, onde as curvas mostraram uma tendência a um aumento crescente (melhores doses 2 e 4 μ M).

Assim, doses mais altas de ácido cafeico ($> 4 \mu\text{M}$) poderiam ser utilizadas, para verificar essa tendência, para as variáveis CR e CA.

$$\text{NUMR: } y = 3.414 + 0.0034x \quad R^2 = 0.0000 \text{ (NS)}$$

$$\text{CR: } y = 1.782 + 0.0745x \quad R^2 = 0.0159 \text{ (NS)}$$

$$\text{CA: } y = 2.102 + 0.0546x \quad R^2 = 0.0464 *$$

Figura 9. Efeito do ácido cafeico sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

Também para o AIB (Figura 10), os modelos quadráticos mostram, para as três variáveis (NUMR, CR e CA), que houve influência do AIB, sendo que, na ausência do mesmo, foram obtidos os melhores resultados.

$$\text{NUMR: } y = 3.803 - 1.185x + 0.498x^2 \quad R^2 = 0.0914 *$$

$$\text{CR: } y = 2.745 - 2.058x + 0.738x^2 \quad R^2 = 0.3403 **$$

$$\text{CA: } y = 2.499 - 0.631x + 0.191x^2 \quad R^2 = 0.2678 **$$

Figura 10. Efeito do AIB sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

Observa-se, pelas Figuras 11, 12 e 13, que as menores médias foram apresentadas pela dose 1 µM de ácido cafeico. Através das Figuras 11 (Tratamentos 1, 5 e 9), 12 e 13, nota-se que, na ausência do AIB, foram obtidos os melhores resultados, não mostrando um efeito sinérgico com o AIB. Caboni et al. (1992), trabalhando com o enraizamento de estacas de maçã, observaram o efeito de vários fenóis. Apenas o floroglucinol mostrou um efeito sinérgico com o AIB. Outros fenóis, tais como o catecol e ácido clorogênico estimularam o enraizamento, somente quando adicionados ao meio de enraizamento sem o AIB.

O uso de ácido cafeico proporcionou aspecto longelínio às plântulas, tanto em relação à parte aérea (maior C A médio em comparação aos demais produtos), como em relação ao comprimento da raiz (maior C R médio em comparação aos demais produtos) (Figura 14)

Figura 11. Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação ácido cafeico x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 12. Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação ácido cafeico x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 13. Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação ácido cafeico x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 14. Plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para o ácido cafeico e AIB.

4.1.3 Experimento 3. Efeito da combinação de doses de resorcina e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

Os resultados da figura abaixo mostram que, na ausência da auxina exógena, a resorcina induziu enraizamento em maior número de plântulas (Figura 21). Caboni et al. (1992) relataram que o catecol e o ácido clorogênico (fenóis) estimularam o enraizamento de estacas de maçã, quando adicionados ao meio de enraizamento sem o AIB.

Doses altas de AIB em combinação com doses altas de resorcina mostraram ter um efeito inibitório.

Figura 15. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a interação resorcina x AIB.

Tabela 9. Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para a resorcina e AIB, aos 20 dias de cultivo.

DOSES	(μM)	NUMR	CR	CA
Resorcina	0	3,090 A	1,525 A	2,010 A
	1	3,210 A	1,555 A	2,000 A
	2	2,780 A	1,580 A	1,930 A
	4	3,400 A	1,375 A	2,010 A
AIB	0	3,640 A	2,370 A	2,300 A
	0,5	2,830 B	1,370 B	2,050 B C
	1	2,890 AB	1,255 B	2,850 B
	2	3,120 AB	1,040 B	1,750 C
F		1,32 ^(NS)	4,29 **	4,22 **
C.V. (%)		30,25	36,74	13,24
Média Geral		3,120	1,5087	1,9875

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Através da Tabela 9, observa-se que as doses de resorcina não tiveram efeito sobre as três variáveis estudadas.

O AIB influenciou o crescimento das plântulas de *Eucalyptus grandis* para todas as variáveis, sendo que a ausência de AIB proporcionou melhores resultados.

Pela Figura 16, os modelos lineares mostram que não houve diferença entre as doses utilizadas de resorcina sobre as três variáveis estudadas. Para a variável NUMR, o aumento da dose de resorcina mostrou uma tendência a um aumento crescente.

Assim, doses mais altas de resorcina ($> 4 \mu\text{M}$) poderiam ser utilizadas, para verificar essa tendência para a variável NUMR e o desempenho das demais variáveis.

$$\text{NUMR: } y = 3.014 + 0.0606x \quad R^2 = 0.0085 \text{ (NS)}$$

$$\text{CR: } y = 1.578 - 0.0396x \quad R^2 = 0.0063 \text{ (NS)}$$

$$\text{CA: } y = 1.99 - 0.0014x \quad R^2 = 0.0000 \text{ (NS)}$$

Figura 16. Efeito da resorcina sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

Já a Figura 17 apresenta os modelos quadráticos para o AIB, onde nota-se que houve influência do AIB sobre as variáveis NUMR, CR e CA, sendo que os melhores resultados foram obtidos na ausência da auxina. Para as variáveis CR e CA observa-se que há uma tendência à diminuição do comprimento, com o aumento das doses de AIB.

$$\text{NUMR: } y = 3.572 - 1.422x + 0.604x^2 \quad R^2 = 0.0925 *$$

$$\text{CR: } y = 2.298 - 1.757x + 0.57x^2 \quad R^2 = 0.4518 **$$

$$\text{CA: } y = 2.304 - 0.614x + 0.168x^2 \quad R^2 = 0.364 **$$

Figura 17. Efeito do AIB sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

Através das Figuras 18, 19 e 20, observa-se que os melhores resultados foram obtidos, para as três variáveis estudadas, na ausência do AIB (Figura 21). Isto confirma os resultados obtidos por Caboni et al. (1992) com estacas de maçã, onde os fenóis catecol e ácido clorogênico estimularam o enraizamento, quando adicionados ao meio de enraizamento sem o AIB. Suas utilizações, juntamente com a auxina, têm um efeito inibitório no crescimento das raízes.

Para o CR, na ausência do AIB, os maiores valores médios foram encontrados utilizando-se 1 e 2 μM de resorcina, apesar da interação não ter sido significativa (Figura 19).

Os dados acima mostram que a resorcina não sinergiza o AIB com relação ao enraizamento.

Figura 18. Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação resorcina x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 19. Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação resorcina x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 20. Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação resorcina x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 21. Plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a resorcina e AIB.

4.1.4 Experimento 4. Efeito da combinação de doses de hidroquinona e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

Pelos dados da Figura 22, observa-se que com o uso da dose mais alta de AIB, a hidroquinona diminuiu a indução de enraizamento, em um maior número de plântulas (Figura 30).

Figura 22. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a interação hidroquinona x AIB.

Tabela 10. Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para a hidroquinona e AIB, aos 20 dias.

DOSES	(μ M)	NUMR	NR	NA
Hidroquinona	0	3,660 A	1,785 A	1,710 A
	1	3,590 A	1,805 A	1,860 A
	2	3,770 A	1,910 A	1,700 A
	4	3,320 A	2,100 A	1,850 A
AIB	0	3,640 A	2,780 A	1,970 A
	0,5	3,510 A	1,815 B	1,780 A B
	1	3,740 A	1,620 B	1,760 B
	2	3,450 A	1,385 B	1,610 B
F		1,59 ^(NS)	2,82 **	2,09 *
C.V. (%)		20,32	38,77	14,11
Média Geral		3,5850	1,9000	1,7800

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Através da Tabela 10, nota-se que não houve influência da hidroquinona sobre as três variáveis estudadas.

O AIB influenciou o enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis* para as variáveis CR e CA, onde as doses mais altas diminuíram o valor médio das variáveis estudadas. Não houve diferença entre as doses para a variável NUMR.

Através da Figura 23, observa-se que a interação foi significativa apenas para as doses de AIB 0 e 1 μ M, onde os modelos quadráticos mostram que, para o AIB 0, a ausência de hidroquinona induziu maior NUMR e, para o AIB 1, a dose de 2 μ M de hidroquinona proporcionou maior número de raízes.

$$\text{AIB 0: } y = 4.0727 - 0.6564x + 0.1364x^2 \quad R^2 = 0.3114 *$$

$$\text{AIB 0.5: } y = 3.696 - 0.1063x \quad R^2 = 0.0275^{(NS)}$$

$$\text{AIB 1: } y = 3.1469 + 1.1625x - 0.2745x^2 \quad R^2 = 0.480 **$$

$$\text{AIB 2: } y = 3.696 - 0.1406x \quad R^2 = 0.0614^{(NS)}$$

Figura 23. Efeito da interação hidroquinona em função do AIB sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para a variável número de raízes (NUMR), aos 20 dias de cultivo.

Nota-se, pela Figura 24, que a interação foi significativa apenas para a dose de hidroquinona 2 µM, onde o modelo quadrático evidencia que o maior NUMR foi apresentado pela dose 1 µM de AIB.

Hidroquinona 0: $y = 3.752 - 0.105x$ $R^2 = 0.0141$ (NS)

Hidroquinona 1: $y = 3.536 + 0.0617x$ $R^2 = 0.0027$ (NS)

Hidroquinona 2: $y = 3.2673 + 2.4127x - 1.2254x^2$ $R^2 = 0.3848$ *

Hidroquinona 4: $y = 3.416 - 0.1097x$ $R^2 = 0.0213$ (NS)

Figura 24. Efeito da interação AIB em função da hidroquinona sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para a variável número de raízes (NUMR), aos 20 dias de cultivo.

Os resultados das Figuras 23 e 24 estão de acordo com os resultados obtidos por James & Thurbon (1981b) que trabalhando com compostos fenólicos que controlam a rizogênese *in vitro* de estacas de maçã, avaliaram vários compostos fenólicos, nas concentrações de $10^{-3}M$, como AIA sinergistas e relataram que dos fenóis simples, apenas o floroglucinol e a hidroquinona tiveram algum efeito no número de raízes.

Pela Figura 25, observa-se que as variáveis CR e CA não apresentaram efeito significativo, sendo que os modelos lineares indicam uma tendência a um aumento na resposta ao enraizamento, com o aumento da dose de hidroquinona.

Assim, doses mais altas de hidroquinona ($> 4 \mu M$) poderiam ser testadas, para verificar essa tendência, para as variáveis CR e CA.

$$\text{CR: } y = 1.755 + 0.083x \quad R^2 = 0.0195 \text{ (NS)}$$

$$\text{CA: } y = 1.74 + 0.023x \quad R^2 = 0.0145 \text{ (NS)}$$

Figura 25. Efeito da hidroquinona sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

O comprimento da raiz foi influenciado pelo AIB, onde o modelo quadrático mostra que a ausência de AIB proporcionou o melhor resultado, o mesmo ocorrendo para a variável CA (modelo linear) (Figura 26).

$$\text{CR: } y = 2.721 - 1.779x + 0.56x^2 \quad R^2 = 0.3515 **$$

$$\text{CA: } y = 1.924 - 0.1646x \quad R^2 = 0.1884 **$$

Figura 26. Efeito do AIB sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea, aos 20 dias de cultivo.

As Figuras 27, 28 e 29 mostram os valores médios para as três variáveis estudadas, onde a variável NUMR mostrou os melhores resultados com a dose 2 μM de hidroquinona e 0,5 e 1 de AIB (Figura 27). O CR da raiz mostrou a enorme influência do AIB, sendo que, na sua ausência, os CR foram os mais altos (Figura 28). A Figura 29 mostra que doses mais altas de AIB (2 μM) influenciaram o CA, diminuindo-o.

O uso de hidroquinona proporcionou um dos CR médios mais altos em relação aos demais produtos.

Figura 27. Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação hidroquinona x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 28. Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação hidroquinona x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 29. Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação hidroquinona x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 30. Plântulas de *Eucalyptus gradis*, aos 20 dias de cultivo, para hidroquinona e AIB.

4.1.5 Experimento 5: Efeito da combinação de doses de ácido clorogênico e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

Para as doses 0, 2 e 4 μM de ácido clorogênico, doses mais altas de AIB (1 e 2 μM) diminuíram a porcentagem de enraizamento das plântulas (Figura 37). Abreu et al. (1993) obtiveram uma maior porcentagem de enraizamento de microestacas de *Eucalyptus citriodora in vitro*, utilizando-se 45,0 mg.L^{-1} de ácido clorogênico e 1,0 mg.L^{-1} de AIB.

Figura 31. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a interação ácido clorogênico x AIB.

Tabela 11. Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para o ácido clorogênico e AIB, aos 20 dias.

DOSES	(μ M)	NUMR	CR	CA
Ác. clorogênico	0	4,220 A	1,765 A	2,120 A
	1	3,860 A	1,495 A	2,080 A
	2	4,530 A	1,675 A	2,180 A
	4	4,290 A	1,780 A	2,060 A
AIB	0	4,580 A	2,290 A	2,340 A
	0,5	3,930 A	1,605 B	2,080 B
	1	3,730 A	1,410 B	2,030 B
	2	4,660 A	1,410 B	1,990 B
F		1,31 ^(NS)	2,88 **	2,74 **
C.V. (%)		31,71	33,00	10,66
Média Geral		4,2250	1,6787	2,1100

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Não houve influência do ácido clorogênico sobre as três variáveis estudadas (Tabela 11).

O AIB mostrou diferença significativa para as variáveis CR e CA, observando-se, na ausência do AIB, os melhores resultados. Caboni et al. (1992) também relataram que os fenóis ácido clorogênico e catecol estimularam o enraizamento de estacas de maçã, quando adicionados ao meio de enraizamento sem o AIB.

O NUMR não foi afetado pelas diferentes doses de AIB.

Os modelos lineares da Figura 32 mostram que não houve influência do ácido clorogênico sobre as variáveis NUMR, CR e CA. O NUMR e o CR mostraram uma tendência a um aumento crescente com doses mais altas de ácido clorogênico.

Assim, doses mais altas de ácido clorogênico ($> 4 \mu\text{M}$) poderiam ser testadas, para verificar essa tendência, para as variáveis NUMR e CR.

$$\text{NUMR: } y = 4.124 + 0.058x \quad R^2 = 0.0038 \text{ (NS)}$$

$$\text{CR: } y = 1.636 + 0.0244x \quad R^2 = 0.003 \text{ (NS)}$$

$$\text{CA: } y = 2.128 - 0.01x \quad R^2 = 0.0033 \text{ (NS)}$$

Figura 32. Efeito do ácido clorogênico sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

A Figura 33 apresenta os modelos quadráticos para as três variáveis, havendo diferença com relação as doses utilizadas de AIB, onde para as variáveis CR e CA, a ausência de AIB proporcionou os melhores resultados, enquanto para a variável NUMR, as melhores doses de AIB foram 0 e 2 μM .

$$\text{NUMR: } y = 4.579 - 1.741x + 0.891x^2 \quad R^2 = 0.0849 *$$

$$\text{CR: } y = 2.261 - 1.398x + 0.489x^2 \quad R^2 = 0.2913 **$$

$$\text{CA: } y = 2.324 - 0.486x + 0.161x^2 \quad R^2 = 0.2526 **$$

Figura 33. Efeito do AIB sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea, aos 20 dias de cultivo.

Nas doses de ácido clorogênico 0 e 1 µM, os melhores resultados para o NUMR foram obtidos na ausência de AIB, mas o maior valor médio para o NUMR foi obtido com a dose 4 µM de ácido clorogênico e 2 µM de AIB (Figura 34). Isto mostra que houve um efeito sinérgico entre o AIB e o ácido clorogênico, estando de acordo com James & Thurbon (1981), que estudaram o efeito de vários compostos fenólicos, como AIA sinergistas, durante a fase de iniciação de raiz de maçã, onde o ácido clorogênico aumentou o número de raízes.

Dentre os experimentos realizados, o maior valor médio para o NUMR foi obtido para o ácido clorogênico e AIB.

Figura 34. Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação ácido clorogênico x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Na ausência de AIB, foram obtidos os melhores resultados para as variáveis CR e CA (Figuras 35 e 36 e 37). Estes resultados estão de acordo com Caboni et al. (1992), onde o ácido clorogênico estimulou o enraizamento de estacas de maçã, quando adicionado ao meio de enraizamento sem o AIB. Seu uso, juntamente com a auxina, tem um efeito inibitório no crescimento das raízes.

Figura 35. Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação ácido clorogênico x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 36. Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação ácido clorogênico x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 37. Plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para o ácido clorogênico e AIB.

4.2 Uso de aminoácidos

4.2.1 **Experimento 6.** Efeito da combinação de doses de fenilalanina e do AIB na porcentagem de enraizamento, no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

Observa-se, pela Figura 38, que a porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis* diminuiu com doses mais altas de AIB. A ausência de AIB proporcionou os melhores resultados (Figura 44).

Figura 38. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a interação fenilalanina x AIB.

Tabela 12. Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para a fenilalanina e AIB, aos 20 dias.

DOSES	(μM)	NUMR	CR	CA
Fenilalanina	0	3,940 A	1,220 A	1,990 A
	1	4,180 A	1,505 A	2,050 A
	2	3,710 A	1,360 A	2,040 A
	4	3,390 A	1,515 A	2,060 A
AIB	0	4,450 A	2,115 A	2,190 A
	0,5	3,460 C B	1,345 B	1,980 B
	1	3,060 C	1,080 B	1,980 B
	2	4,250 A B	1,060 B	1,990 A B
F		2,22 **	4,12 **	1,85 *
C.V. (%)		30,06	39,5	11,98
Média Geral		3,8050	1,4000	2,0350

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Através da Tabela 12, nota-se que não houve influência da fenilalanina sobre as três variáveis estudadas.

Os dados da mesma tabela mostram que as doses de AIB influenciaram o NUMR, sendo que as doses 0 e 2 μM mostraram os melhores resultados. Para o CR, a ausência de AIB proporcionou o melhor resultado, enquanto que, para o CA, a ausência de AIB não diferiu da dose 2 μM .

A Figura 39 mostra os modelos lineares para as três variáveis estudadas, onde as doses de fenilalanina não tiveram efeito sobre o enraizamento, apesar da tendência a um aumento crescente para a variável CR.

Assim, doses mais altas de fenilalanina (> 4 μM) poderiam ser testadas, para verificar essa tendência, para a variável CR.

$$\text{NUMR: } y = 4.10 - 0.169x \quad R^2 = 0.0372^{(NS)}$$

$$\text{CR: } y = 1.303 + 0.055x \quad R^2 = 0.0127^{(NS)}$$

$$\text{CA: } y = 2.01 + 0.014x \quad R^2 = 0.0063^{(NS)}$$

Figura 39. Efeito da fenilalanina sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

Para o AIB, os modelos quadráticos mostram que para o NUMR os melhores resultados foram obtidos na ausência de AIB e com 2 μM de AIB e, para as variáveis CR e CA, a ausência de AIB proporcionou melhores resultados (Figura 40).

$$\text{NUMR: } y = 4.456 - 2.664x + 1.28x^2 \quad R^2 = 0.1928^{**}$$

$$\text{CR: } y = 2.088 - 1.616x + 0.553x^2 \quad R^2 = 0.3417^{**}$$

$$\text{CA: } y = 2.173 - 0.365x + 0.138x^2 \quad R^2 = 0.101^{*}$$

Figura 40 Efeito do AIB sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea, aos 20 dias de cultivo.

Através da Figura 41, observa-se que o maior NUMR foi obtido pelo dose 1 µM de fenilalanina e 2 µM de AIB. A dose 4 µM de fenilalanina em combinação com o AIB diminuiu o NUMR das plântulas.

Figura 41. Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação fenilalanina x AIB, aos 20 dias de cultivo.

A Figura 42 evidencia que as doses 0,5 1 e 2 μM de AIB diminuíram o CR, pois os maiores comprimentos foram obtidos na sua ausência (Figura 44). A dose 4 μM de fenilalanina proporcionou o maior CR na ausência do AIB.

Apesar das doses crescentes de fenilalanina terem aumentado o comprimento da raiz na ausência do AIB, a média geral desse experimento, para a variável CR, foi uma das menores em comparação aos demais experimentos.

Os dados da Figura 42 mostram que a fenilalanina influenciou o enraizamento. Isto talvez tenha acontecido porque a fenilalanina é uma precursora de fenóis (Marziah et al, 1993), e, segundo Mattos (1982), os efeitos positivos de compostos fenólicos no enraizamento *in vitro* se devem à inibição da AIA-oxidase pelos mesmos, prevenindo, assim, a destruição da auxina.

Figura 42. Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação fenilalanina x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Já a Figura 43 mostra que houve uma pequena diferença na ausência do AIB para os tratamentos 5, 9 e 13, aumentando o CA.

Figura 43. Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação fenilalanina x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Os dados acima obtidos mostram que não há um efeito sinérgico entre a fenilalanina e o AIB.

Figura 44. Plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a fenilalanina e AIB.

4.2.2 Experimento 7. Efeito da combinação de doses de prolina e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

A Figura 45 evidencia que houve uma diminuição da porcentagem de enraizamento com a utilização das doses 1 e 2 μM de AIB, para os tratamentos com 0, 2 e 4 μM de prolina (Figura 53). Para esses mesmos tratamentos, a ausência de AIB propiciou os melhores resultados.

A maior porcentagem de enraizamento foi obtida pelo tratamento 6, utilizando-se 1 μM de prolina e 0,5 μM de AIB. Druart (1986-1987), citado por Orlikowska (1992), também relatou um aumento na porcentagem de gemas enraizadas de *Prunus avium* e *P. cerasus*, utilizando-se a prolina. Kamada & Harada (1979), citados por Orlikowska, (1992), trabalhando com explantes de gema de *Torenia fournieri*, observaram que a prolina estimulou a rizogênese na presença de ANA.

Figura 45. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a interação prolina x AIB.

Tabela 13. Comparação dos valores médio do NUMR, CR e CA para a prolina e AIB, aos 20 dias.

DOSES	(μ M)	NUMR	CR	CA
Prolina	0	3,350 A B	1,620 A	2,020 A
	1	3,700 A	1,550 A	1,950 A
	2	3,620 A	1,660 A	2,040 A
	4	2,820 B	1,710 A	2,020 A
AIB	0	3,880 A	2,210 A	2,130 A
	0,5	3,610 A	1,705 B	2,020 A B
	1	2,820 B	1,340 B	1,920 B
	2	3,180 A B	1,285 B	1,960 A B
F		3,09 **	3,44**	1,17 ^(NS)
C.V. (%)		25,63	33,99	12,47
Média Geral		3,3725	1,6350	2,0075

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Através da Tabela 13, observa-se que não houve influência da prolina sobre as variáveis CR e CA. Para o NUMR as melhores doses utilizadas foram 1 e 2 μ M, não diferindo da dose 0.

O AIB apresentou influência sobre as três variáveis. Para o CR, a ausência de AIB apresentou o maior valor, diferindo das demais doses (Figura 53). Os maiores valores médios obtidos para o NUMR e CA também foram apresentados na ausência do AIB.

A Figura 46 mostra a interação de doses de prolina em função das doses de AIB, onde se observa que essa interação foi significativa apenas para a dose 2 μ M de AIB, sendo que o modelo quadrático evidencia que as doses de prolina 1 e 2 μ M proporcionaram o maior NUMR, ocorrendo a partir daí uma queda acentuada.

$$\text{AIB 0: } y = 4.128 - 0.1417x \quad R^2 = 0.0463 \text{ (NS)}$$

$$\text{AIB 0.5: } y = 4.056 - 0.2548x \quad R^2 = 0.1528 \text{ (NS)}$$

$$\text{AIB 1: } y = 2.832 - 0.0068x \quad R^2 = 0.0001 \text{ (NS)}$$

$$\text{AIB 2: } y = 2.984 + 1.012x \quad R^2 = 0.3363 *$$

Figura 46. Efeito da interação prolina em função de AIB, para a variável número de raízes (NUMR), aos 20 dias de cultivo.

A Figura 47, doses de AIB em função de doses de prolina, mostra que a interação foi significativa para prolina 0 μM, onde o modelo quadrático mostra que o melhor resultado foi obtido na ausência de AIB e para prolina 4 μM, onde o modelo linear mostra que o melhor resultado também foi obtido na ausência de AIB.

Prolina 0: $y = 4.4585 - 2.5705x + 0.8691x^2$ $R^2 = 0.4693$ **

Prolina 1: $y = 3.552 + 0.1691x$ $R^2 = 0.0145$ (NS)

Prolina 2: $y = 3.896 - 0.3154x$ $R^2 = 0.0477$ (NS)

Prolina 4: $y = 3.328 - 0.5806x$ $R^2 = 0.2520$ *

Figura 47. Efeito da interação AIB em função da prolina, para a variável número de raízes (NUMR), aos 20 dias de cultivo.

Os modelos lineares da Figura 48 mostram que não houve efeito da prolina sobre as variáveis CR e CA, apesar da variável CR apresentar uma tendência a um aumento crescente.

Assim, doses mais altas de prolina ($> 4 \mu\text{M}$) poderiam ser testadas, para verificar essa tendência, para a variável CR.

$$\text{CR: } y = 1.582 + 0.0302x \quad R^2 = 0.0041 \text{ (NS)}$$

$$\text{CA: } y = 1.996 + 0.0066x \quad R^2 = 0.0015 \text{ (NS)}$$

Figura 48. Efeito da prolina sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

Os modelos quadráticos evidenciam que o AIB influenciou o crescimento das plântulas, sendo que na sua ausência foram obtidos os melhores resultados (Figura 49).

$$\text{CR: } y = 2.217 - 1.259x + 0.396x^2 \quad R^2 = 0.2812 **$$

$$\text{CA: } y = 2.136 - 0.3197x + 0.115x^2 \quad R^2 = 0.0957 *$$

Figura 49. Efeito do AIB sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea, aos 20 dias de cultivo.

Através das Figuras 50, 51 e 52, observa-se os valores médios para as variáveis NUMR, CR e CA, respectivamente.

A Figura 50 evidencia que os maiores valores médios para o NUMR foram obtidos com 1 µM de prolina e 0,5 µM de AIB e 2 µM de prolina e 0 de AIB, em contraste com os valores obtidos por Orlikowska (1992), trabalhando com o enraizamento de estacas de maçã, onde o NUMR por gema enraizada nos tratamentos sem arginina aumentou com o aumento das concentrações de AIB, acima de 5,0 µM.

Druart (1986-1987), citado por Orlikowska (1992), observou também que a prolina aumentou o número de raízes por gema enraizada em *Prunus*.

Os maiores valores de CR foram obtidos na ausência de AIB e com 4 μM de prolina (Figura 51). Doses mais altas de AIB diminuíram o CR.

A variável CA apresentou apenas uma pequena variação na ausência de AIB, para as doses 2 e 4 μM de prolina (Figura 52).

Figura 50. Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação prolina x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 51. Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação prolina x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 52. Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação prolina x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Os dados das Figuras 50, 51 e 52 mostram que não houve um efeito sinérgico entre a prolina e o AIB, para as doses 0, 2 e 4 μM de prolina, para as três variáveis, e para a dose 1 μM , para a variável CA. Já a dose 1 μM de prolina, para as variáveis NUMR e CR, mostrou um efeito sinérgico entre a prolina e o AIB.

Kim et al. (1994) relataram que a prolina é utilizada, geralmente, em meios de cultura para a indução de embriões somáticos, associada ou não à diferentes combinações de auxinas.

Figura 53. Plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a prolina e AIB.

4.2.3 Experimento 8. Efeito da combinação de doses de triptofano e do AIB na porcentagem de enraizamento (%R), no número de raízes (NUMR), no comprimento da raiz (CR) e no comprimento da parte aérea (CA).

Pela Figura abaixo, nota-se que, na ausência do AIB, o triptofano induziu enraizamento em um maior número de plântulas. Doses altas de AIB diminuíram a porcentagem de enraizamento das mesmas (Figura 60).

Figura 54. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para a interação triptofano x AIB.

Tabela 14. Comparação dos valores médios do NUMR, CR e CA para o triptofano e AIB, aos 20 dias.

DOSES	(μ M)	NUMR	CR	CA
Triptofano	0	2,900 A	1,140 A	1,930 A
	1	2,810 A	1,215 A	1,870 A
	2	2,820 A	1,430 A	1,920 A
	4	3,270 A	1,350 A	1,890 A
AIB	0	4,090 A	2,400 A	2,140 A
	0,5	2,800 B	1,235 B	1,890 B
	1	2,410 B	0,785 C B	1,870 B
	2	2,500 B	0,715 C	1,710 B
F		2,41 **	7,80 **	2,04**
C.V. (%)		36,9	43,91	12,95
Média Geral		2,9500	1,2837	1,9025

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Pela Tabela 14, observa-se que não houve influência do triptofano sobre as três variáveis estudadas. O NUMR apresentou maior valor médio para a dose de 4 μ M de triptofano. Orlikowska (1992) também relatou um aumento no número de raízes de uma variedade de maçã, utilizando alguns aminoácidos, dentre eles o triptofano.

A ausência de AIB proporcionou os melhores resultados de enraizamento para as mesmas variáveis.

Os modelos lineares da Figura 55 confirmam os dados da Tabela 14, onde não houve diferença entre as doses, mostrando uma tendência a um aumento crescente para as variáveis NUMR e CR.

Assim, doses mais altas de triptofano (> 4 μ M) poderiam ser testadas, para verificar essa tendência, para as variáveis NUMR e CR.

$$\text{NUMR: } y = 2.774 + 0.1006x \quad R^2 = 0.0141 \text{ (NS)}$$

$$\text{CR: } y = 1.186 + 0.056x \quad R^2 = 0.0083 \text{ (NS)}$$

$$\text{CA: } y = 1.912 - 0.005x \quad R^2 = 0.0009 \text{ (NS)}$$

Figura 55. Efeito do triptofano sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), aos 20 dias de cultivo.

Os modelos quadráticos da Figura 56 mostram que a ausência de AIB influenciou o enraizamento das plântulas para as três variáveis estudadas, aumentando os seus valores.

$$\text{NUMR: } y = 4.04 - 2.698x + 0.968x^2 \quad R^2 = 0.285 **$$

$$\text{CR: } y = 2.364 - 2.483x + 0.832x^2 \quad R^2 = 0.5455 **$$

$$\text{CA: } y = 2.118 - 0.384x + 0.092x^2 \quad R^2 = 0.2957 **$$

Figura 56. Efeito do AIB sobre plântulas de *Eucalyptus grandis*, para as variáveis número de raízes (NUMR), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea, aos 20 dias de cultivo.

Observa-se, pelas Figuras 57, 58 e 59 que na ausência de AIB foram obtidos os melhores resultados para todas as variáveis estudadas (Figura 60), mas as variáveis que sofreram maiores alterações foram o NUMR e o CR, apesar do CR apresentado pelo triptofano ter sido o menor dentre os demais produtos testados.

Figura 57. Comparação dos valores médios do número de raízes (NUMR) para a interação triptofano x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 58. Comparação dos valores médios do comprimento da raiz (CR) para a interação triptofano x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Figura 59. Comparação dos valores médios do comprimento da parte aérea (CA) para a interação triptofano x AIB, aos 20 dias de cultivo.

Os dados das Figura 57, 58 e 59 mostram que o triptofano não sinergiza o AIB nas doses utilizadas.

Figura 60. Plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para o triptofano e AIB.

4.3 Comparação entre os diversos experimentos e tratamentos

As melhores médias para porcentagem de enraizamento foram obtidas nos experimentos 2 (ácido cafeico e AIB), 4 (hidroquinona e AIB), 8 (ácido clorogênico e AIB) e 1 (floroglucinol e AIB) (Figura 61).

Figura 61. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para todos os experimentos.

Na ausência da auxina exógena, todos os aditivos ou cofatores utilizados nos experimentos, induziram o enraizamento em um maior número de plântulas. As maiores doses de AIB propiciaram uma menor porcentagem de enraizamento (Figura 62 e (Figuras 7, 14, 21, 30, 37, 44, 53 e 60).

Figura 62. Porcentagem de enraizamento das plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para todos os tratamentos.

A maior média do NUMR foi obtida pelo experimento com ácido clorogênico e AIB, seguida pela média do experimento com floroglucinol e AIB (Figura 63).

Figura 63. Valores médios do número de raízes de plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo.

A maior média para a variável CR foi obtida pelo experimento com ácido cafeico e AIB, seguida pela média do experimento com hidroquinona e AIB. Para a variável CA, obteve-se a maior média com o experimento com ácido cafeico e AIB, seguida pela média do experimento com ácido clorogênico e AIB (Figura 64).

Figura 64. Valores médios de plântulas de *Eucalyptus grandis*, aos 20 dias de cultivo, para as variáveis comprimento de raiz e comprimento da parte aérea.

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu concluir que:

- O uso de fenóis induziu enraizamento em um maior número de plântulas, em relação aos experimentos que utilizaram aminoácidos;
- O ácido clorogênico e o floroglucinol mostraram os valores médios mais altos para o número de raízes;
- O ácido cafeico e a hidroquinona apresentaram os valores médios mais altos para o comprimento da raiz, enquanto que os valores médios mais altos para o comprimento da parte aérea foram proporcionados pelo ácido cafeico e ácido clorogênico e
- Doses menores que 1 mM de floroglucinol deveriam ser testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL KADER, A. M. *In vitro* propagation of apple: comparative response of three cultivars to cytokinin and auxin. **Acta Horticulturae**, n.300, p.155-161, Jan. 1992.
- ABREU, I.N.de; MARTINS, M.; PINTO, J.E.B.P. Efeito de compostos fenólicos no enraizamento de microestacas de *Eucalyptus citriodora*, *in vitro*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, Brasília, 1993. **Anais**. Brasília:REDBIO, 1993. p.148.
- AL-MAARRI, K.; ARNAUD, Y.; MIGINIAC, E. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar "Passe Crassane" seedlings and cultivar "Williams": factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.58, n.3, p.207-214, 1994.
- ALVAREZ, R.; NISSEN, S.J.; SUTTER, E.G. Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured *in vitro* and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid. **Plant Physiology**, v.89, p.439-443, 1989.
- BANDEL, G. **Desenvolvimento e diferenciação em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1979. Depto. Genética, 159p.
- BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A ; OJIMA, M. et al. Produção de mudas de figueira "Roxo de Valinhos" através da cultura *in vitro*. **O Agrônomo**, v.44, n.1/3, p.6-10, 1992.

- BENNETT, I.J.; McCOMB, J.A.; TONKIN, 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**, v.74, n.1, p.53-58, 1994.
- BERARDI, G.; INFANTE, R.; NERI, D. Micropropagation of *Pyrus calleryana* Dcn. from seedlings. **Scientia Horticulturae**, v.53, p.157-165, 1993.
- BERARDI, G.; NERI, D.; MAIORINO, A ; ADVERSI, R. *In vitro* rooting of *Pyrus calleryana*. **Acta Horticulturae**, n.300, p.181-188, Jan. 1992.
- BLEASDALE, J.K.A **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EDUSP, 1977.
- BLOMSTEDT, C.; CAMERON, J.; WHITEMAN, P.; CHANDLER, S.F. Micropropagation of juvenile *Eucalyptus regnans* (mountain ash). **Australian Journal of Botany**, v.39, p.179-186, 1991.
- BOLLMARK, M.; ELIASSON, L. A rooting inhibitor present in Norway spruce seedling grown at high irradiance - a putative cytokinin. **Physiologia Plantarum**, v.80, p.527-533, 1990.
- CABONI, E.; BOUMIS, G.; DAMIANO, C. Effects of phenols, gibberellic acid and carbohydrates on the rooting of the apple rootstock M9 Jork. **Agronomie**, v.12, n.10, p.789-794, May 1992.
- CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. em meio de cultura líquido e sólido. Piracicaba, 1993. 113p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- CURIR, P.; Van SUMERE, C.F.; TERMINI, A.; BARTHE, P.; MARCHESINI, A.; DOLCI, M. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gumii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. **Plant Physiology**, v.92, n.4, p.1148-1153, 1990.
- DAMIANO, C.; CURIR, P.; ESPOSITO, P.; RUFFONI, B. Present micropropagation research programs at I.S.F. in Sanremo. **Acta Horticulturae**, n.251, p.129-133, 1989.
- DAMIANO, C.; CHIARIOTTI, A. ; CABONI, E.; QUARTA, R.; BOUMIS, G. Some factors affecting the induction and the expression of rooting in different fruit species *in vitro*. **Acta Horticulturae**, n.300, p.211-224, Jan. 1992.
- DAS, T.; MITRA, G.C. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.22, n.2, p.95-103, 1990.
- DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.21, n.3, p.191-199, June 1990.
- GALSTON, A W.; DAVIES, P.J. **Mecanismos de controle no desenvolvimento vegetal**. São Paulo: Edgard Blucher; EDUSP, 1972. 171p.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. Plant growth regulators. In: GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. cap. 7, p. 284-330.

- GONÇALVES, A N. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake in cell and tissue culture systems. In: SIMPOSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro, 1980.
- GORDON, S.A ; PALEG, L.G. Formation of auxin from tryptophan through action of polyphenols. **Plant Physiology**, v.36, p.838-845, 1961.
- HAMMATT, N. Micropropagation of fastigate bird cherry (*Prunus padus* L.) and adventitious shoot formation from leaves. **Journal of Horticultural Science**, v.68, n.6, p.975-981, 1993.
- HAMMATT, N. Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L.). **Plant Growth Regulation**, v.14, n.2, p.127-132, 1994. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1994/
- HOWARD, B.H.; JONES, O.P.; VASEK, J. Growth characteristics of apparently rejuvenated plum shoots. **Journal of Horticultural Science**, v.64, n.2, p.157-162, Mar. 1989.
- HUANG, L.C.; CHIU, D.S.; MURASHIGE, T.; GUNDY, R.V.; MAHDI, E.F.M.; NAGAI, K.; PLIEGO-ALFARRO, F. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A.C. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1990. cap.3, p.251-264.
- JAMES, D.J.; THURBON, I.J. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M.9. **Journal of Horticultural Science**, v.54, n.4, p.309-311, 1979.

- JAMES, D.J.; THURBON, I.J. Phenolic compounds and other factors controlling rhizogenesis *in vitro* in the apple rootstocks M.9 and M.26. **Zeitschrift-fur-Pflanzenphysiologie**, v.105, n.1, p.11-20, 1981a. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1981/
- JAMES, D.J.; THURBON, I.J. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol. **Journal of Horticultural Science**, v.56, n.1, p.15-20, Jan, 1981b.
- JONES, N.B.; STADEN, J.VAN.; VAN-STADEN, J. Micropropagation and establishment of *Eucalyptus grandis* hybrids. **South African Journal of Botany**, v.60, n.2, p.122-126, 1994.
- JONES, O P.; HATFIELD, S.F.S. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. **Journal of Horticultural Science**, v.51, n.4, p.495-499, 1976.
- KAVI KISHOR, P.B. Aromatic amino acid metabolism during organogenesis in rice callus culture. **Physiologia Plantarum**, v.75, p.395-398, 1989.
- KIM, Y.W.; LEE, B.C.; LEE, S.K.; JANG, S.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Quercus acutissima*. **Plant Cell Reports**, v.13, n.6, p.315-318, 1994.
- KORNOVA, K.M.; MICHAILOVA, J. Study of the *in vitro* rooting of Kazanlak oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.). **Journal of Essential Oil Research**, v.6, n.5, p.485-492, 1994. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1994/

- KRIEKEN, W.M.; BRETELER, H.; VISSER, M.H.M. Indolebutyric acid-induced root formation in apple tissue culture. Design for an experimental system, auxin metabolism and isolation of cDNA clones related to root initiation. **Acta Horticulturae**, n.289, p.343-344, 1991.
- LEOPOLD, A C.; PLUMMER, T.H. Auxin-phenol complexes. **Plant Physiology**, v.36, p.589-592, 1961.
- MARZIAH, M.; IYER, K.D.N.; MUSE, R.; YOU, C.B.; CHEN, Z.L.; DING, Y. Production of polyphenols in cultured tissues of cocoa, *Theobroma cacao*. In: Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, 1., 1993. Proceedings. /Resumo em CAB Abstracts on CD-ROM, 1993/
- MATTOS, E.B. Enraizamento *in vitro* de brotações de macieira (*Malus domestica* Borkh.), cvs. Golden Delicious e Gala e porta-enxerto MM-106. Pelotas, 1982. 45p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas.
- METIVIER, J.R. Citocininas. In: FERRI, M.C. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1985. v.2, cap.2, p.93-128.
- NÉMETH, C. Adventitious root induction by substituted 2-chloro-3-phenyl-propionitriles in apple rootstocks cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.14, n.3, p.253-259, Mar. 1981.
- ORLIKOWSKA, T. Influence of arginine on *in vitro* rooting of dwarf apple rootstock. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.31, p.9-14, 1992.

- PELOSI, A.; LEE, M.C.S.; CHANDLER, S.F.; HAMILL, J.D. Hormonal control of root primordia differentiation and root formation in cultured explants of *Eucalyptus globulus* seedlings. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, n.3, p.409-415, 1995.
- PEREIRA, A.M.S.; MORO, J.R.; CERDEIRA, R.M.M.; FRANCA, S.C. Micropropagation of *Maytenus aquifolium* Martius. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v.2, n.3, p.11-18, 1994. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1994/
- PIERIK, R.L.M. Rejuvenation and Micropropagation. **Newsletter**, v.62, p.11-21, 1990.
- POULSEN, C.; VERPOORTE, R. Roles of chorismate mutase, isochorismate synthase and anthranilate synthase in plants. **Phytochemistry**, v.30, n.2, p.377-386, Feb. 1991.
- RAO, K.S. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Plant Cell Reports**, v.7, n.7, p.546-549, 1988.
- RAO, P.V.L. *In vitro* plant regeneration of scented-leaved geranium *Pelargonium graveolens*. **Plant Science**, v.98, n.2, p.193-198, May 1994.
- ROSSI, V.; DE PAOLI, G.; DAL POZZO, P. Propagation of *Pyrus calleryana* sel. D6 by *in vitro* culture. **Acta Horticulturae**, n.300, p.145-148, Jan. 1992.
- SABATER, F.; ACOSTA, M.; SÁNCHEZ-BRAVO, J.; CUELLO, J.; RIO, J.A. Indole-3-methanol as an intermediate in the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase. **Physiologia Plantarum**, v.57, n.1, p.75-78, 1983.

SHAWKY, I.; DAMIANO, C.; EL-HENNAWY, H.; CHEARIOTI, A ; EL-WAKEEL, H. Studies on the behaviour of proliferated shoots of M.26 apple rootstock *in vitro*. **Annals of Agricultural Science**, v.38, n.2, p.691-697, 1993. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1993/

SICHA, J.; BECKER, H.; DUSEK, J.; HUBIK, J.; SIATKA, T.; HRONES, I. Callus cultures of the genus Echinacea II. Effect of phenylalanine on the growth of cultures and the production of cinnamic acids. **Pharmazie**, v.46, n.5, p.-363-364, 1991. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1991/

SRISKANDARAJAH , S.; MULLINS, M.G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, v.56, p.71-76, Jan. 1981.

VÁLIO, I.F.M. Auxinas. In: FERRI, M.F. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1985. v.2, cap.2, p.39-72.

VIEITEZ, A M.; SANCHEZ, C.; SAN-JOSE, C. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. **Scientia Horticulturae**, v.41, ns.1-2, p.151-159, 1989.

YUI, E. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de macieira (**Malus domestica** Borkh.). Lavras, 1990. 69p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.

WEBSTER, C.A ; JONES, O P. Micropropagation of the apple rootstock M.9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, v.64, n.4, p.421-428, July 1989.

WILSON, P.J.; VAN STADEN, J. Rhizocaline, rooting co-factors and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting - a review. **Annals of Botany**, v.66, n.4. p.479-490, Oct. 1990.

ZIMMERMAN, R.H. Rooting apple cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.3, n.4, p.301-311, 1984.

ZIMMERMAN, R.H.; BROOME, O C. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.106, n.5, p.648-652, July 1981.

APÊNDICE

Quadro 1 -Composição do meio de cultura segundo GONÇALVES (1980) modificado.

	Concentração mg/l
MACRONUTRIENTES	
NH_4NO_3	800
KNO_3	1000
KH_2PO_4	170
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
MICRONUTRIENTES	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	37,3
H_3BO_3	6,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,7
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0
KI	0,75
VITAMINAS	
Meso Inositol	100
Tiamina	5
Piridoxina	0,5
Ácido Nicotínico	0,5
Pantotenato de Cálcio	1