

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS

**Propagação vegetativa por estaquia utilizando rebrota de cepas de
árvores adultas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke)**

CAMILLA MARTINS BOTELHO

Manaus, Amazonas
Junho de 2016

CAMILLA MARTINS BOTELHO

**Propagação vegetativa por estaquia utilizando rebrota de cepas de
árvores adultas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke)**

Orientador: Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio

Coorientadora: Dr.^a Regina Caetano Quisen

Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciências de Florestas Tropicais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA/MCTI), área de concentração: silvicultura tropical.

Manaus, Amazonas
Junho de 2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS

DEFESA PÚBLICA DISSERTAÇÃO / PPG-CFT - INPA

Ata da Defesa Pública da Dissertação de Mestrado de CAMILLA MARTINS BOTELHO aluno (a) do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS, realizada no dia 30 de Junho de 2016.

Aos trinta dias do mês de Junho de 2016, às 09h00, na Sala de Aula 01 do Programa de PG em Ciências de Florestas Tropicais, PPG-CFT, Campus III, INPA-V8, realizou-se a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado intitulada: "PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ESTAQUIA UTILIZANDO REBROTA DE CEPAS DE ÁRVORES ADULTAS DE PAU-ROSA (ANIBA ROSAEODORA DUCKE)" em conformidade com o Artigo 68 do Regimento Interno do PPG-CFT e Artigo 52 do Regimento Geral da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA) como parte final de seu trabalho para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS, área de concentração em *Manejo Florestal*. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: ROBERVAL MONTEIRO BEZERRA DE LIMA (EMBRAPA), SIDNEY ALBERTO DO NASCIMENTO FERREIRA (UFAM) e JOÃO CARLOS DE SOUZA MATOS (GARDNERS). O(a) Presidente da Banca Examinadora, Dr(a) Paulo de Tarso Sampaio (Orientador(a)/INPA), deu início à sessão convidando os senhores membros e o (a) Mestrando (a) a tomarem seus lugares e informou sobre os procedimentos a serem observados para o prosseguimento do exame. A palavra foi, então, facultada ao (à) Mestrando (a) que apresentou uma síntese do seu estudo e respondeu às perguntas formuladas pelos membros da Banca Examinadora. Depois da apresentação e arguição, a referida Banca Examinadora se reuniu e decidiu por


A sessão foi encerrada às _____ e, para constar eu, Valdecira Azevedo, Secretária do PPG-CFT lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada foi assinada pelo Presidente e membros da Banca Examinadora. Em Manaus (AM), 30 de Junho de 2016.

Banca Examinadora:


Dr(a) ROBERVAL MONTEIRO B. DE LIMA Aprovado(a) Reprovado(a)

Dr(a) SIDNEY ALBERTO DO N. FERREIRA Aprovado(a) Reprovado(a)

Dr(a) JOÃO CARLOS DE SOUZA MATOS Aprovado(a) Reprovado(a)


Dr. Paulo de Tarso Sampaio
Presidente da Banca
Orientador


Regina Caetano Quisen
Coorientadora


Dr. Jose Francisco de C. Gonçalves
Coordenador do PPGCFT

B748 Botelho, Camilla Martins

Propagação vegetativa por estaquia utilizando rebrota de cepas de árvores adultas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) / Camilla Martins Botelho --- Manaus: [s.n.], 2016.
x, 46 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2016.
Orientador: Paulo de Tarso Barbosa Sampaio
Coorientadora: Regina Caetano Quisen
Área de concentração: Ciências de Florestas Tropicais

1. Substrato. 2. Ácido Indolbutírico. 3. Tipo de estaca. 4. Rizogênese.
5. Carboidratos. I. Título.

CDD 634.9565

Sinopse:

Este trabalho estudou a interferência do substrato, do ácido indolbutírico e do tipo de estaca no enraizamento de propágulos de pau-rosa, retirados da rebrota da cepa de indivíduos adultos, correlacionou o teor de carboidratos de cada tipo de estaca com o enraizamento e emissão de brotos e descreveu o processo anatômico de formação da raiz adventícia.

Palavras-chave: Substrato, ácido indolbutírico, tipo de estaca, rizogênese, carboidratos.

Agradecimentos

Foi uma caminhada longa e com muitas dificuldades, mas gratificante e riquíssima em aprendizagem. Tenho muito a agradecer pelas lições, ajudas, conforto e carinho. Da gigante lista de agradecimentos generalizo aqui o meu Obrigado!

O primeiro agradecimento vai à Deus pela oportunidade concedida e pessoas conhecidas.

Ao INPA e Embrapa Amazônia Ocidental, que me receberam de braços aberto, com funcionários dispostos a ajudar a encontrar um caminho para as metas estabelecidas.

Aos colegas e amigos dessas instituições, que sempre davam motivação e compartilhavam angústias, alívios e alegrias.

À Capes, por me conceder a bolsa de pesquisa.

Aos orientadores (formais e informais) por me guiarem no caminho da estatística, fisiologia e anatomia vegetal, além da propagação vegetativa. Em especial a Dr^a Regina, quem sempre me trazia à razão nos desesperos, e ao Dr. Paulo, quem me concedeu e me aceitou na pesquisa.

À empresa Magaldi Agrocomercial e Industrial Ltda, que financiou a pesquisa, e aos seus funcionários, que formaram uma excelente equipe de campo.

Ao IFAM – Maués pelo apoio, especialmente na pessoa dos professores Anndson, Alcides e Vanderlei. Também aos estagiários Brenda e Hiago do curso técnico em agropecuária, que acompanharam, trabalharam, decepcionaram e se alegraram comigo no decorrer dos experimentos.

À Dona Maricilda e Isabela, quem me acolheram em Maués e estavam sempre ao meu lado durante todo o período de desenvolvimento da pesquisa, como em uma família.

Assim como também o pessoal da “Pencionetes”, cúmplices, confidentes, conselheiros... que virou “a família manauara”.

Ao meu namorado Alessandro, quem não media esforços para me ajudar no que for.

À toda família que ficou em Minas e deu todo apoio desde o período da prova de seleção. Um agradecimento especial aos meus pais, Mayana e João Batista, e minha irmã Ana Maria, que acompanharam todo o percurso mesmo estando longe. Também a minha avó Hebe, fiel torcedora, e meu avô Camilo (*in memoria*).

Deixo aqui o meu MUITO OBRIGADO a vocês!

“Cada fracasso ensina ao homem algo que ele precisava aprender”.

(Charles Dickens, em Oliver Twist)

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

Resumo

O pau-rosa, *Aniba rosaeodora*, é uma espécie nativa da Amazônia de interesse econômico que está ameaçada de extinção devido à intensa exploração extrativista. No intuito de obter uma alternativa que concilie exploração e conservação, este trabalho busca desenvolver a técnica mais adequada de estaquia para a produção de mudas visando o plantio comercial. O objetivo foi avaliar o enraizamento de estacas provenientes de rebrotas da cepa de pau-rosa adulto utilizando diferentes concentrações de auxina, substratos e tipos de estaca, bem como descrever o processo histológico da formação das raízes adventícias. Para isso, três experimentos foram instalados: E1 - teste com quatro concentrações de ácido indolbutírico (AIB) via talco (0,0; 1,5; 3,0; 6,0 g kg⁻¹) e três tipos de substrato (areia, vermiculita e areia + vermiculita); E2 - teste com quatro tipos de estaca (apical, intermediária e basal, obtidas do ramo de rebrotas, e o tipo “rebrote”, retirado diretamente das rebrotas), nos quais verificou os teores de carboidratos solúveis e amido no momento da instalação; e E3 - análise histológica do enraizamento. Para E1 e E2 avaliou sobrevivência (%), enraizamento (%), número de raízes adventícias e comprimento da maior raiz por estaca (cm). No E2 avaliou ainda o número de brotos, comprimento do maior broto (cm) e a presença de calos (%). Para o enraizamento, a concentração de 3,0 g kg⁻¹ AIB foi significativamente melhor que o controle (0,0 g kg⁻¹) e a vermiculita como substrato foi superior à areia. Apesar de não ter ocorrido interação entre substrato e AIB, o uso da auxina mostrou uma tendência a um melhor enraizamento quando utilizado vermiculita ou vermiculita + areia como substrato. Dentre os tipos de estaca, o rebrote foi superior para a maioria das variáveis, diferindo das demais quanto à emissão de brotos e de calos. Também foi maior quanto ao teor de amido, que correlacionou positivamente com a emissão de brotos. A raiz adventícia tem sua origem no parênquima formado acima do xilema devido à atividade do câmbio vascular. A existência de um anel de esclerênquima contínuo após o floema pode funcionar como uma barreira mecânica ao surgimento da raiz.

Palavras chave: Substrato, ácido indolbutírico, tipo de estaca, rizogênese, carboidratos.

Abstract

Vegetative propagation by cuttings using regrowth of strains rosewood grown trees (*Aniba rosaeodora* Ducke)

The rosewood, *Aniba rosaeodora*, is a native Amazonian species of economic interest that is threatened with extinction due to intensive extractive exploitation. So, in order to obtain an alternative that reconciles exploration and conservation, we seek to develop the most appropriate cutting technique for the production of seedlings for commercial planting. Therefore, in this study, we investigated the rooting ability of cuttings from adult rosewood shoots using different concentrations of auxin, substrates, and kind of cuttings, as well as described the histological process of adventitious root formation. Three experiments were installed: E1 - test with four concentrations of indolebutyric acid (IBA) via talc (0,0, 1,5, 3,0, 6,0 g kg⁻¹) and three types of substrate (sand, vermiculite, and sand + vermiculite); E2 - test with four types of cuttings (apical, intermediate and basal, obtained from the regrowth branch, and the "regrowth" type, removed from the regrowth itself), in which we verified the soluble carbohydrate and starch contents; And E3 - histological analysis of rooting. For E1 and E2 we evaluated survival (%), rooting (%) and the mean number of adventitious roots, and the length of the longest root per cutting (cm). In E2 we also evaluated the mean number of shoots, length of the largest shoot (cm), and presence of callus (%). Significantly better rooting response was observed with 3.0 g kg⁻¹ IBA compared to the control (0.0 g kg⁻¹ IBA) and with vermiculite substrate compared to the sand. Although there was no interaction between substrate and IBA, the use of auxin showed a tendency to better rooting when using vermiculite or vermiculite + sand as a substrate. Among the types of cuttings, the sprouting was superior for most of the variables, differing from the others in relation to shoot and callus emission. It was also higher in the starch content, which correlated positively with shoot emission. The adventitious root has its origin in the parenchyma formed above the xylem due to the activity of the vascular cambium. The existence of a ring of continuous sclerenchyma after the phloem can act as a mechanical barrier to the emergence of the root.

Keywords: substrate; indolebutyric acid; collection position; histology; carbohydrates.

Sumário

Resumo	vi
Abstract.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1.Caracterização do pau-rosa	3
O interesse pela espécie.....	6
2.2.A propagação vegetativa pelo método da estaquia	8
Fatores que influenciam o enraizamento	9
A propagação vegetativa no pau-rosa.....	14
3. OBJETIVO	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Estabelecimento e condução dos experimentos	16
Determinação do teor de carboidratos.....	20
Análise estatística	20
Análise histológica	21
5. RESULTADOS	22
Análise histológica	26
6. DISCUSSÃO.....	29
Análise histológica	34
7. CONCLUSÃO.....	36
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
APÊNDICE A – Quadros resumo das análises de variância (ANOVA).....	42
APÊNDICE B – Boxplot das variáveis respostas para AIB e substrato	43
APÊNDICE C – Boxplot das variáveis respostas para tipo de estaca.....	44
APÊNDICE D – Fotos de estacas enraizadas.....	45

Lista de figuras

Figura 1: Árvore do pau-rosa (à esquerda) e o detalhe da coloração da casca (direita).....	4
Figura 2: Os frutos verdes e maduros e as sementes do pau-rosa.	5
Figura 3: Distribuição atual do pau-rosa no Brasil.....	6
Figura 4: Ilustração do propágulo coletado e estaca cortada.....	16
Figura 5: Representação da coleta e confecção dos propágulos: A – estacas obtidas das posições apical, intermediária e basal do ramo das rebrotas de cepas do pau-rosa adulto; B – mais de uma estaca obtida direto da rebrota de cepas que, após misturadas entre si, compoem a parcela do tipo “rebrote” no experimento.	18
Figura 6: Ambientes de enraizamento: A - viveiro em Maués; B - casa de vegetação da Embrapa em Manaus, Amazonas.....	19
Figura 7: Temperatura e umidade relativa do ar (U.R.) no viveiro em Maués, Amazonas. Máximas e mínimas registradas de maio a novembro de 2015.....	19
Figura 8: Amostra da base da estaca do pau-rosa para análise anatômica, seccionada em três subamostras, com uma destas seccionada longitudinalmente ao meio.	22
Figura 9: Porcentagem média de estacas enraizadas em areia (A), vermiculita (V) e areia + vermiculita (AV) em função das concentrações do AIB. Os pontos no gráfico representam os pontos médios de cada substrato nos quatro blocos.	24
Figura 10: Porcentagem de estacas vivas, com brotos, enraizadas e com calos em cada um dos tipos de estacas e seus respectivos desvios padrão (barras finas).....	24
Figura 11: Correlação de Pearson entre as porcentagens de estacas com brotos e estacas enraizadas e com calo; e entre as porcentagens de estacas com calo e estacas enraizadas. As retas evidenciam a correlação dos pontos.....	25
Figura 12: Teores de carboidratos (mg g^{-1} de massa seca) em função do tipo de estaca e seu respectivos desvios padrão (barras finas).	25
Figura 13: Correlação de Pearson das porcentagens de estacas vivas, com brotos e enraizadas com os teores de Carboidratos solúveis e Amido. As retas evidenciam os pontos nos quais houve correlação.....	26
Figura 14: Secções transversais da base da estaca do pau-rosa aos 0, 15, 30, 45, 60 e 90 dias após o estaqueamento.....	28

Figura 15: Testes histoquímicos: A (7 dias) e B (15 dias) – teste com Lugol para verificar a presença de grãos de amido (setas); C (15 dias) e D (45 dias) – teste com Cloreto Férrico para verificar a presença de compostos fenólicos (setas).....	29
Figura 16: Boxplot das variáveis em função dos substratos (areia [A], vermiculita [V] e areia + vermiculita [AV]) e das concentrações de AIB (experimento 1).....	43
Figura 17: Boxplot das variáveis em função do tipo de estaca apical, intermediária, basal e direto do rebroto (experimento 2).....	44
Figura 18: Estacas do experimento 1 enraizadas nos diferentes substratos e concentrações de auxina. Nas faixas amarelas A = areia, V = vermiculita e AV = areia+vermiculita, seguido da concentração de AIB (0; 1,5; 3,0 e 6,0 mg kg ⁻¹). Em detalhe a base das estacas.....	46
Figura 19: Estacas do experimento 2 (tipo de estaca) com emissão de brotos após um mês do estaqueamento (a esquerda) e de raízes após quatro meses (a direita).....	46

1. INTRODUÇÃO

A *Aniba rosaeodora* Ducke (pau-rosa), árvore típica da Floresta Amazônica, é encontrada no Brasil nos estados do Pará, Amazonas e Amapá. Tornou-se conhecida por ter um óleo de odor forte e perfumado devido à presença do álcool linalol, extraído da destilação do seu tronco principalmente (Sampaio *et al.*, 2003). Explorada desde a década de 1920 e de forma indiscriminada para alimentar a indústria de perfumaria, a regeneração natural não acompanhou o ritmo da derrubada das árvores, resultando no declínio das populações naturais do Estado do Pará e em grande parte do Amazonas (Homma, 2005). Atualmente sua ocorrência natural está restrita a áreas distantes e de difícil acesso (Homma, 2005), sendo rara a ocorrência de árvores de grande porte (Leite *et al.*, 1999). Como consequência dessa realidade, a espécie faz parte de listas internacionais de espécies ameaçadas (CITES, 2010; IUCN, 2014).

A demanda comercial pelo óleo linalol é contínua, o que gera a necessidade de alternativas de exploração econômica que viabilizem e conciliem os interesses comerciais à conservação da espécie. Neste sentido, os plantios comerciais de pau-rosa, nos diversos modelos de exploração já propostos, apresentam-se como uma solução viável que ainda requer o domínio de tecnologias disponíveis, principalmente no que se refere à produção de mudas.

A obtenção de sementes em quantidades suficientes para produzir mudas e estabelecer plantios enfrenta algumas dificuldades tais como a existência de poucos remanescentes naturais (Leite *et al.*, 1999), a variação fenológica da espécie (Sampaio *et al.*, 2003), a irregularidade em quantidade e periodicidade na produção de frutos, o período prolongado de maturação (Sampaio *et al.*, 2003; Spironello *et al.*, 2004) e a predação de frutos/sementes por aves e insetos (Spironello *et al.*, 2004). Dificultando ainda mais a produção de mudas seminal, soma-se o fato desta espécie possuir sementes recalcitrantes, ou seja, não toleram armazenamento, além de possuir um tegumento que causa certa resistência física a germinação (Sampaio *et al.*, 2003) e um percentual de germinação considerado bastante variável, de 39 a 91% (Ohashi e Rosa, 2004).

Assim como para a maioria das espécies florestais tropicais, os conhecimentos de técnicas de produção de mudas alternativas ao método via seminal são insuficientes para a implementação do processo produtivo, além de limitar os trabalhos de melhoramento genético com estas culturas. Dentre estas técnicas cita-se a propagação assexuada via estaquia, método no qual ocorre a indução do enraizamento adventício em segmentos destacados da planta-mãe que, uma vez submetidos a condições favoráveis, originam uma muda clonal (Hartmann *et al.*, 2011).

A estaquia é uma técnica amplamente empregada em espécies de valor comercial que proporciona em um curto espaço de tempo, a produção de grande quantidade de mudas de qualidade, sendo que a eficiência do processo depende da facilidade de enraizamento de cada espécie, da qualidade do sistema radicular formado e do desenvolvimento posterior da planta (Oliveira *et al.*, 2001). Este é um processo possível devido ao princípio da totipotência celular, onde as células somáticas adquirem propriedades metabólicas, estruturais e funcionais distintas daquelas de suas células progenitores e assumem atividades meristemáticas mediante a desdiferenciação (pontos meristemáticos de crescimento) e subsequente diferenciação celular em primórdios radiculares e desenvolvimento e emergência das novas raízes (Alfenas *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2011).

Um dos grandes desafios na estaquia de plantas lenhosas é a obtenção da juvenilidade no propágulo vegetativo utilizado, visando maximizar a totipotência das células, e favorecendo assim o enraizamento adventício (Wendling e Xavier, 2001). As árvores possuem um gradiente de juvenilidade ao longo do tronco que, quanto mais próximo do centro onde aconteceram as primeiras divisões celulares, maior as características juvenis das células (Hartmann *et al.*, 2011). Segundo diversos autores, esse gradiente e/ou as técnicas que promovam o rejuvenescimento, ou seja, o retorno do material vegetal da fase madura para a juvenil, tal como a indução à emissão de novos brotos, tem influenciado positivamente no sucesso do enraizamento de algumas espécies (Bitencourt *et al.*, 2009; Ky-Dembele *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2012). De acordo com Wendling e Xavier (2001), o uso de propágulos com maior juvenilidade promove maior percentual, velocidade e qualidade de enraizamento, resultando em melhor qualidade das mudas.

Além da juvenilidade, o grau de lignificação e as diferenças nutricionais e fisiológicas também estão ligados à posição de coleta da estaca. Estacas apicais tendem a ser mais herbáceas, desidratar mais facilmente, possuir poucas reservas, mas possuem células meristemáticas ativas, ou seja, que já possuem a capacidade de divisão celular (Hartmann *et al.*, 2011; Xavier *et al.* 2013). Já as basais, geralmente são mais lignificadas, podem possuir um anel de esclerênquima já formado, mas tendem a possuir mais reservas, como os carboidratos que são fontes de energia e carbono, além de um material genético mais novo (Negrelle e Doni, 2001; Hartmann *et al.*, 2011; Xavier *et al.* 2013).

A aplicação exógena de reguladores de crescimento, tal como as auxinas, são essenciais para possibilitar e acelerar a formação de raízes de estacas de diversas espécies. Sintetizado naturalmente nas regiões de crescimento ativo, zonas meristemáticas como gemas e folhas

jovens principalmente, e translocado para as partes basais, esse hormônio, além de estar envolvido em diversas atividades fisiológicas, promove a indução do processo de enraizamento (Hartmann *et al.*, 2011). Em alguns casos a concentração endógena de auxinas não é suficiente, sendo necessária a aplicação exógena, podendo o efeito ser diferenciado quando aplicada no estado líquido ou em pó (Salvador *et al.*, 2014).

Segundo Sampaio e Costa (2010), Menezes (2006) e Samapio *et al.* (1989), a propagação de estacas e mini-estacas de material juvenil de pau-rosa independem do uso de reguladores de crescimento, no entanto, a sua presença pode aumentar a porcentagem de sobrevivência, o número de raízes formadas e o comprimento médio destas raízes, fatores que estão diretamente ligados com o desenvolvimento da muda tanto no viveiro quanto no campo.

Os fatores externos (temperatura e umidade) são responsáveis por propiciar as condições favoráveis ao processo de rizogênese, uma vez que ainda não existe raiz para absorver água do substrato, estes são primordiais para controlar a transpiração das estacas e evitar a desidratação do propágulo (Stuepp *et al.*, 2015). O substrato é crucial para o desenvolvimento das raízes, visto que possui a função de manter as condições ideais na base da estaca para o desenvolvimento e crescimento da raiz, permitir boa aeração, drenagem, umidade e manter uma temperatura propícia para a multiplicação celular e reações bioquímicas (Mendonça *et al.*, 2010).

A estaquia na *A. rosaeodora* é possível, principalmente utilizando propágulos juvenis (Sampaio *et al.*, 1989; Menezes, 2006) provenientes da atividade de exploração desta cultura, onde são realizados corte de árvores ou a poda intensa dos galhos, resultando na formação de rebrotos nas cepas e nos ramos (Ohashi *et al.*, 2004; Sampaio *et al.*, 2007). No entanto, os resultados obtidos até o momento vêm demonstrando a necessidade de estudos mais detalhados sobre os fatores externos e internos que interferem no enraizamento, e assim poder contribuir para compor um método de propagação vegetativa eficiente a nível comercial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Caracterização do pau-rosa

O pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), pertencente à família Lauraceae, possui duas sinónimas: *Aniba rosaeodora* var. *amazonica* Ducke e *Aniba duckei* Kostermans (Sampaio *et al.*, 2003; Ohashi e Rosa, 2004). A árvore pode alcançar 30 m de altura, ocupando o dossel

intermediário ou superior da floresta, e chegar a 2 m de diâmetro (Ducke, 1938; Sampaio *et al.*, 2003; Ohashi e Rosa, 2004).

O tronco é reto e cilíndrico, de casca pardo-amarelada ou avermelhada que se desprende facilmente em grandes placas (Figura 1). O fuste se ramifica no ápice formando uma copa pequena e estreita, ou ovalada. É uma espécie perenifólia com folhas alternas, coriácea, de superfície superior glabra e inferior levemente pubescente (Ducke, 1938; Sampaio *et al.*, 2003; Ohashi e Rosa, 2004).



Figura 1: Árvore do pau-rosa (à esquerda) e o detalhe da coloração da casca (direita).

A fenologia reprodutiva é irregular e varia conforme a localização geográfica (Leite *et al.*, 1999; Sampaio *et al.*, 2003; Ohashi e Rosa, 2004). Para a região de Manaus, a floração quando presente ocorre de Outubro a Março e a frutificação, que possui alta de Janeiro a Agosto, se estende por todo ano (Magalhães e Alencar, 1979).

As flores são diminutas hermafroditas em inflorescência. Para evitar a autofecundação, a reprodução ocorre por fecundação cruzada com dicogamia sincronizada. Como resultado se tem um fruto do tipo baga inserido em uma cúpula e uma semente ovoide (Figura 2) (Ducke, 1938; Sampaio *et al.*, 2003; Ohashi e Rosa, 2004; Spironello *et al.*, 2004).



Figura 2: Os frutos verdes e maduros e as sementes do pau-rosa. Fonte: Sampaio *et al.*, 2003.

Ao amadurecerem os frutos adquirem uma coloração roxa-escura, desprendem-se da cúpula e caem. No chão, ficam ainda mais susceptíveis a predadores, que também os procuram quando ainda na árvore (Sampaio *et al.*, 2003; Spironello *et al.*, 2004).

As sementes são recalcitrantes sem dormência. Possuem resistência física a germinação provocada por um tegumento delgado, liso e opaco que as envolvem (Sampaio *et al.*, 2003).

A *A. rosaeodora* pode ser encontrada na região amazônica do Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Peru, Colômbia e Equador. No Brasil ocorre nos estados do Amapá, Amazonas e Pará, com a maior concentração na Amazônia Ocidental (Ducke, 1938; Sudam, 1972; Leite *et al.*, 1999). Habita a floresta de terra firme e a capinarana, sobre latossolos amarelos e vermelhos, mas também solos arenosos (Ohashi e Rosa, 2004; Souza e Lorenzi, 2005).

A distribuição é irregular com agrupamentos de 5 a 8 árvores, que ocorrem de 50 a 100 m de distância entre si e de 300 a 400 m entre grupos (Souza e Lorenzi, 2005). Carvalho (1983), estudando a regeneração natural da espécie na Floresta Nacional do Tapajós, observou a distribuição irregular com o agrupamento ocorrendo entre indivíduos superiores a 3 m de altura. Já nas plantas menores, a distribuição encontrada foi aleatória com tendência ao agrupamento.

Em decorrência da intensa exploração, o pau-rosa passou a ter uma distribuição isolada ou em agrupamentos muito distantes uns dos outros, restritos mais à porção ocidental da Amazônia e a unidades de conservação. Apresenta-se como espécie rara, sendo difícil encontrar árvores de grande porte (Leite *et al.*, 1999).

utilizada, apesar de render menos. São 1,0% a 2,3% de rendimento de óleo nas folhas e 0,9% a 1,6% nos galhos finos comparados com 1,4% de rendimento no tronco (Souza *et al.*, 2007). Leite *et al.* (2001) afirmam que são necessárias 11 árvores de 1 m de diâmetro cada para produzir um tambor de 185 kg de essência.

Essa exploração predatória indiscriminada, com a derrubada de indivíduos jovens e adultos, limitou os remanescentes da espécie a áreas afastadas das margens dos rios, ficando difícil o acesso para os exploradores (SUDAM, 1972; Leite *et al.*, 1999). Tal situação levou, em 1992, a inclusão da espécie na Lista Nacional de Espécies Ameaçadas (IBAMA, 1992). Alguns anos depois, foi incluída na Lista Vermelha da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais), na categoria de espécie ameaçada (IUCN, 2014). Mais recentemente, a espécie entrou no Anexo II da lista do CITES (Comércio Internacional de Espécie da Flora e Fauna Selvagens Ameaçadas de Extinção), passando a ter restrições globais e monitoramento dos processos de exportação e importação, nos padrões internacionais de sustentabilidade, de partes da espécie e produtos derivados (CITES, 2010).

A partir da década de 60, houve a queda da exploração da espécie, influenciada principalmente pelo aumento do custo da exploração, devido às dificuldades de encontrar e transportar as árvores, a concorrência no mercado com compostos alternativos naturais e sintéticos e a inexistência de uma política florestal determinante para o setor (Homma, 2005). Segundo o mesmo autor, o crescimento da exploração do pau-rosa é limitado pela dependência dos estoques naturais.

Tendo em vista a demanda pela espécie e a percepção do seu esgotamento e na tentativa de manter a atividade econômica, já na década de 30 o governo tentou obrigar os extratores a reporem com muda cada árvore derrubada, mas não obteve sucesso (Homma, 2005). Anos depois, na década de 90, tentou incentivar o plantio racional (IBAMA, 1992). Entretanto tais atitudes não surtiram efeitos animadores devido ao desestímulo pelo qual o setor passava e à falta de conhecimento da ecologia e silvicultura do pau-rosa. Dos plantios exigidos, os que se realizaram foram com a obtenção de mudas da regeneração natural (Homma, 2005).

Conscientizados quanto à necessidade de conservar a espécie para garantir matéria prima e incentivados pelo crescimento da consciência ambiental dos consumidores, os exploradores passaram a se interessar em domesticá-la e manejá-la de forma a obter o óleo sem efetuar o corte raso (Leite *et al.*, 2001). Surgiu então a necessidade de propagar o pau-rosa, seja por via sexuada ou assexuada, para atender a demanda por mudas para os plantios (Jardim *et al.*, 2010).

No entanto, apesar dos avanços no conhecimento sobre a ecologia da planta, pouco se sabe sobre o planejamento e o manejo adequado para plantios comerciais. O primeiro desafio é a produção de mudas, já apontada por Magalhães e Alencar em 1979 ao mencionarem as dificuldades de se obter sementes suficientes e a necessidade de meios alternativos à propagação.

As dificuldades de obtenção das sementes se iniciam com os poucos remanescentes naturais da *A. rosaeodora* (Leite *et al.*, 1999). A alta predação dos frutos e a frutificação acíclica e irregular (Sampaio *et al.*, 2003; Spironello *et al.*, 2004) soma-se a intolerância das sementes ao armazenamento (recalcitrantes) e a presença de um tegumento que causa resistência física a germinação (Sampaio *et al.*, 2003). Além do mais, essa espécie possui uma porcentagem de germinação que varia de 39% a 91% (Ohashi e Rosa, 2004). Mesmo assim, a produção de mudas seminais é a dominante atualmente, consistindo na coleta dos frutos no chão e na árvore, retirada do tegumento das sementes deixando-as de molho na água e semeadura em sementeira e posterior repicagem.

Mudas seminais possuem o tempo de desenvolvimento variado umas das outras, que vem se acumulando desde a germinação, e resulta em mudas com crescimento heterogêneo, o que dificulta o manejo no viveiro e o tempo de expedição para o campo. Tais barreiras destacam a necessidade de se investir em propagação vegetativa, obtendo-se assim mudas com crescimento mais homogêneo, seleção genética mais eficiente e em escala comercial. Além de ser uma forma de preservar a espécie, uma vez que pode ser um meio fácil, barato e eficaz para realizar estoque de plantio com atributos desejáveis à domesticação (Baul *et al.*, 2011) e não mais necessitar da extração natural.

2.2. A propagação vegetativa pelo método da estaquia

A propagação vegetativa surge com a necessidade de melhorar a produtividade através da clonagem de indivíduos com características desejáveis (Hartmann *et al.*, 2011). Por permitir multiplicar um genótipo sem perder os atributos considerados superiores, é uma ferramenta utilizada principalmente em programas de melhoramento genético. Dentre os meios de propagação a estaquia se destaca pela viabilidade econômica em se estabelecer plantios clonais em curto tempo (Paiva e Gomes, 2005).

A propagação vegetativa por estaquia é a técnica na qual se promove o enraizamento adventício e o desenvolvimento aéreo de segmentos destacados da planta mãe, denominados

estacas, por meio do fornecimento de condições favoráveis (Hartmann *et al.*, 2011). As estacas podem ser do ramo, folha ou raiz da planta matriz e irão gerar indivíduos com constituição genética iguais ao que lhes deram origem, os chamados clones (Paiva e Gomes, 2005).

Essa técnica é comumente utilizada para a produção de mudas de eucalipto em larga escala no Brasil, mas também pode ser desenvolvida para a propagação de lenhosas nativas (Leandro e Yuyama, 2008; Silva *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2012, 2013; Melo *et al.*, 2012). Comparando a variedade existente de espécies nativas comerciais, pode-se dizer que poucos são os estudos sobre estaquia em espécies florestais nativas e quase nada se sabe para o seu emprego a nível comercial (Dias *et al.*, 2012), principalmente se tratando de nativas da Amazônia.

O principal limitador para a estaquia em produção comercial é a capacidade genética e fisiológica das espécies em promover o enraizamento adventício e essa baixa capacidade está presente em muitas das espécies de interesse comercial (Hartmann *et al.*, 2011). Técnicas que promovam o resgate da juvenilidade do material adulto têm sido usadas, como anelamento do caule, uso do fogo, podas de galhos e corte raso, que estimulam a brotação (Alfenas *et al.*, 2009). No entanto, ainda há questionamentos sobre a eficiência desse rejuvenescimento e qual a técnica mais adequada (Wendling *et al.*, 2014b). Assim, para que a estaquia seja viável, são necessários estudos prévios sobre a capacidade de resgate do material adulto visando a eficiência da retomada à divisão celular e consequente enraizamento, também sobre o ambiente de propagação adequado e os tipos de propágulos (Dias *et al.*, 2012).

Fatores que influenciam o enraizamento

A formação de raízes adventícias determina o sucesso da propagação por estaquia e ela ocorre em três fases: formação de células meristemáticas (indução), diferenciação em primórdios radiculares (iniciação) e desenvolvimento e emergência das novas raízes (expressão ou alongação) (Hartmann *et al.*, 2011). Todo o mecanismo é regido por fatores externos (umidade, temperatura, luz e substrato) e os internos (condição fisiológica da matriz, idade da matriz, tipo de estaca) (Paiva e Gomes, 2005).

Os fatores externos são controlados segundo o sistema de condução e manejo dado ao ambiente de propagação, que varia de acordo com a espécie propagada. A umidade é um dos fatores primordiais para o sucesso, pois, o seu alto grau mantém a turgidez do propágulo evitando a desidratação do material (Zuffellato-Ribas e Rodrigues, 2001; Paiva e Gomes, 2005). Ela é controlada pelo tempo, frequência e vazão da irrigação.

A temperatura está diretamente ligada ao metabolismo, elevando a taxa de enraizamento até um ponto ótimo, a partir do qual o enraizamento é prejudicado e a mortalidade dos propágulos aumenta (Rasmussen *et al.*, 2009). Paiva e Gomes (2005) afirmam que a maior temperatura do substrato em relação a temperatura do ar proporciona uma maior atividade da base da estaca, com redução da taxa de respiração e da perda d'água pela parte aérea, mantendo o bom estado fisiológico do material.

A luminosidade envolve irradiância, fotoperíodo e qualidade da luz, sendo fonte de energia necessária à produção de fotoassimilados, como carboidratos e auxinas, exigidos para o enraizamento (Xavier *et al.*, 2013). A redução da luminosidade em relação ao meio externo também está associada ao controle de temperatura e umidade do ambiente.

A função do substrato é sustentar as estacas e oferecer condições adequadas para o desenvolvimento e crescimento do sistema radicular (Xavier *et al.*, 2013). Pra Alfenas *et al.* (2009) a escolha do substrato deve levar em consideração as suas características físico-químicas e o comportamento da espécie a ser propagada, bem como a sua facilidade de obtenção. Segundo os mesmo autores, é considerado ideal quando tem composição uniforme, baixa densidade, estabilidade volumétrica e granulométrica, boa porosidade, elevada capacidade de troca de cátion (CTC), boa retenção de água, aeração e drenagem e também isenção de pragas e patógenos. Em espécies de fácil enraizamento, o tipo de substrato não tem grande influência na emissão de raiz, porém, para as de difícil enraizamento, a escolha é determinante na porcentagem e qualidade do sistema radicular formado (Xavier *et al.*, 2013).

Os fatores internos que rege o mecanismo de enraizamento são conduzidos pela fisiologia da planta, que se alteram com o passar dos anos. O avançar da idade promove alterações na escala morfológica, anatômica e fisiológica dos vegetais que vão interferir negativamente no potencial de enraizamento e vigor das estacas (Wendling e Xavier, 2001; Santos *et al.*, 2011; Wendling *et al.*, 2014a).

Espécies lenhosas adultas normalmente possuem dificuldades de enraizar, pois a especialização de suas células é tamanha, que aumenta a dificuldade da desdiferenciação celular e conseqüente formação das células meristemáticas (Negrelle e Doni, 2001; Hartmann *et al.*, 2011). A desdiferenciação é a retomada das células à capacidade de se diferenciar em uma célula especializada qualquer e de se dividir (Hartmann *et al.*, 2011). Assim, estacas originadas de mudas possuem maior potencial de enraizamento do que as de indivíduos adultos (Menezes, 2006; Ky-Dembele *et al.*, 2011).

A juvenilidade tem sido um dos principais fatores que afetam o sucesso da propagação vegetativa por estaca (Hartmann *et al.*, 2011). O uso do propágulo com maior grau de juvenilidade permite a obtenção de um maior percentual, velocidade e qualidade de enraizamento, bem como uma melhor qualidade das mudas produzidas (Wendling e Xavier, 2001).

Uma forma de reverter a planta da fase madura para a juvenil é o rejuvenescimento do material com a indução a emissão de novos brotos (Bitencourt *et al.*, 2009; Ky-Dembele *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2012). Para o *Eucalyptus*, gênero com alto desenvolvimento da tecnologia de propagação vegetativa no Brasil, o rejuvenescimento por poda drástica ou corte raso da árvore resulta em estacas com alto potencial de enraizamento (Wendling e Xavier, 2001).

O efeito da maturidade no enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foi observado por Bitencourt *et al.* (2009). Propágulos retirados de brotações do ano, em árvores de 13 anos de idade, obtiveram um menor enraizamento quando comparadas com estacas de brotos rejuvenescidos pela decepa de árvores com 17 anos. Ou seja, mesmo sendo de uma árvore mais velha, o material rejuvenescido possui maior capacidade de enraizar do que um material obtido de um adulto mais novo.

Árvores lenhosas adultas possuem gradiente de juvenilidade ao longo do tronco. Os meristemas mais basais se formaram no período das primeiras divisões celulares, portanto maior as características juvenis, logo, maior o potencial de enraizamento. Isto se deve à conservação das células formadas na fase juvenil da planta, mantendo características como as capacidades de diferenciação e multiplicação celular, necessárias à formação de raízes na estaca (Hartmann *et al.*, 2011).

A posição de coleta da estaca no ramo também tem efeito sobre o enraizamento. As brotações laterais mais próximas do ramo ou caule central da árvore apresentam maior grau de juvenilidade do que as partes mais extremas (Hartmann *et al.*, 2002). Em um estudo com o maracujazeiro amarelo (*Passiflora actinia*) Albuquerque Júnior *et al.* (2013) observaram maior enraizamento, número médio de raízes e comprimento médio das raízes em estacas da posição basal do ramo quando comparadas com as da intermediária e apical. As estacas desta última posição morreram. Já em um teste com o pau-jacaré (*Piptadenia gonoacantha*), Hernández *et al.* (2012) observou um melhor enraizamento e vigor das raízes em estacas apicais de brotações epicórmicas do que as intermediárias e basais.

Em espécies lenhosas adultas a posição no ramo está associada ao grau de lignificação. Segundo Hartmann *et al.* (2002) as partes jovens de um ramo, ou seja, as partes herbáceas, não

enraízam ou enraízam com dificuldade devido a poucas reservas e substâncias favoráveis ao enraizamento. No entanto, segundo os mesmos autores, as partes maduras, lignificadas, possuem dificuldades para enraizar devido à dificuldade para a desdiferenciação das células e da passagem das raízes pelos tecidos lignificados.

Em guaco (*Mikania glomerata*), estacas semilenhosas com folhas brotaram antes e com mais eficiência do que as lenhosas e também as herbáceas (Negrelle e Doni, 2001). A sobrevivência dos brotos está ligada a emissão de raízes, logo, pode-se dizer que o grau de lignificação e a pouca reserva interferiram no enraizamento. Já com a candeia (*Eremanthus erythropappus*) os maiores percentuais de enraizamento foram encontrados para as estacas apicais de rebrota e com folhas do que para basais (Melo *et al.*, 2012).

Apesar das herbáceas não possuírem substâncias favoráveis armazenadas, como os carboidratos que são fontes de energia e carbono, detêm a vantagem de possuir células meristemáticas ativas, aptas à divisão celular (Negrelle e Doni, 2001; Hartmann *et al.*, 2011). Essa característica, juntamente com a manutenção da fotossíntese pela presença de folhas, pode favorecer o melhor enraizamento deste material (Negrelle e Doni, 2001; Leandro e Yuyama, 2008).

Pode-se perceber que, além dos já citados posição da estaca na árvore e diferenciação dos tecidos, também pode influenciar na propagação por estaquia a quantidade de reservas armazenadas (Hartmann *et al.*, 2011; Oliveira *et al.* 2012). O teor de carboidrato, assim como substâncias promotoras ou inibidoras do enraizamento, apresenta variação ao longo do ramo e da árvore, sendo utilizado como fonte de carbono para a brotação e posterior formação das raízes (Hartmann *et al.*, 2011).

A quantidade de amido está associada ao enraizamento e sobrevivência de estacas (Oliveira e Ribeiro, 2013). Quanto mais próximo da base do ramo se retira as estacas, condições mais favoráveis a formação de muda elas possuem (Albuquerque Júnior *et al.*, 2013). Segundo Hartmann *et al.* (2011), o ramo possui variação na concentração de carboidratos, substâncias nitrogenadas, aminoácidos, auxinas e compostos fenólicos devido ao gradiente das condições fisiológicas, aumentando quanto mais próximo da parte apical que está sob intenso metabolismo.

A presença das folhas permite a manutenção da síntese de carboidratos pelo processo da fotossíntese, fonte de energia e carbono para a formação das raízes. Também possibilita sintetizar auxinas e cofatores necessários para o estímulo e crescimento das raízes adventícias (Hartmann *et al.*, 2011). Isso justifica o baixo enraizamento em estacas herbáceas e

semilenhosas de castanha de cutia (*Couepia edulis*) com ausência de folhas e o maior em estacas herbáceas com folhas inteiras ou reduzidas a metade (Leandro e Yuyama, 2008).

A auxina endógena (AIA) é sintetizada pelas partes novas, regiões meristemáticas (gemas, folhas jovens e ápice das raízes) e são transportadas para as partes basais da planta, onde estimulam o enraizamento se o balanço hormonal entre auxinas, giberelinas, citocininas e cofatores estiver apropriado (Hartmann *et al.*, 2011). A sua concentração em determinado órgão ou tecido está relacionada com o crescimento, estimulando, inibindo e promovendo a diferenciação. Com a confecção da estaca, esse fitohormônio se armazena na base destas juntamente com carboidratos, compostos nitrogenados e outras substâncias. Sua ação envolve a síntese de proteínas para promover o alongamento celular (Zuffellato-Ribas e Rodrigues, 2001).

Melhores resultados da estaquia podem ser conseguidos em algumas espécies com um tratamento prévio do material vegetativo com auxina exógena. Esta, após aplicação, aumenta a produção do AIA endógeno e atua acelerando o seu encontro com os aminoácidos que sintetizam as proteínas necessárias ao enraizamento (Souza *et al.*, 2007).

A quantidade de auxina exógena a ser aplicado varia com a espécie (Dias *et al.*, 2012) e pode ser afetado também pela idade fisiológica da planta, condições ambientais e posição de coleta do material (Hartmann *et al.*, 2011). O mais utilizado em propagação vegetativa é o AIB (ácido indolbutírico), porém, para algumas espécies nativas, apesar de aumentar o número de raízes por estacas, o seu uso não apresenta diferença significativa em termos da porcentagem de enraizamento quando comparado com a não utilização (Xavier *et al.*, 2003; Bastos *et al.*, 2004; Leandro e Yuyama, 2008; Bitencourt *et al.*, 2009; Sampaio *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2012). Já no camu-camu (*Myrciaria dubia*), o uso dos reguladores de crescimento em estacas de plantas adultas com um par de folhas aumentou a porcentagem de enraizamento (Silva *et al.*, 2009).

Contudo, para a utilização da estaquia como forma de propagação não basta promover o enraizamento, é necessária a formação de um bom sistema radicular para o desenvolvimento da parte aérea de qualidade. Um sistema radicular bem formado possui no mínimo quatro raízes principais, bem distribuídas, fisiologicamente ativas, com boa agregação ao substrato e sem envelhecimento (Alfenas *et al.*, 2009). Assim é possível se ter uma muda de qualidade, com relação parte aérea e parte radicular equilibrada, tornando eficiente o processo de estaquia.

A propagação vegetativa no pau-rosa

O material ideal para a estaquia de qualquer indivíduo é aquele que impede ou diminui as perdas por inaptidão do propágulo (Wendling e Xavier, 2001). Para isso, é necessária a obtenção de propágulos viáveis, com boa capacidade de enraizamento e de se desenvolver em uma nova planta, características essas que estão associadas com a origem genética da planta matriz e a juvenilidade das brotações (Ferrari *et al.*, 2004).

Os ramos juvenis, obtidos tanto das mudas quanto das rebrotas de plantas adultas, são considerados o material ideal para a propagação por estaquia do pau-rosa (Sampaio *et al.*, 1989; Leite *et al.*, 2001; Menezes, 2006). Favorável ao uso dessa técnica, a espécie tem a boa capacidade de rebrota e o procedimento de exploração que, com o abate da árvore ou poda intensa dos galhos, estimulam a produção de brotos (Ohashi *et al.*, 2004; Sampaio *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2007). Tal situação torna oportuno o uso desse material rejuvenescido como propágulo.

Para a propagação vegetativa dessa espécie já foi observado que o fator juvenilidade é fundamental nos propágulos (Menezes, 2006). Os resultados com estacas de material rejuvenescido (Sampaio *et al.*, 1989) e material juvenil de mudas (Menezes, 2006) foram superiores aos com estacas de material adulto (Menezes, 2006). Além disso, a sobrevivência do adulto foi muito baixa quando comparada com a de estacas obtidas de mudas (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação da sobrevivência e enraizamento de estacas obtidas de materiais de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) com diferentes graus de juvenilidade

Artigos	Material	Sobrevivência	Enraizamento
Sampaio <i>et al.</i> , 1989	Rebrota de cepa	95%	80%
	Juvenil	75%	72%
Menezes, 2006	Adulto	16%	8%
	Mini-estaca	98%	88%
Sampaio e Costa, 2010	Juvenil	68%	71%
	Mini-estaca	98%	88%

Assim sendo, é possível afirmar que a maior juvenilidade dos propágulos resulta em uma maior probabilidade de sucesso na propagação dessa espécie e na velocidade de surgimento de raízes (Menezes, 2006). No entanto é necessário aperfeiçoar as técnicas de estaquia já aplicadas (Sampaio *et al.*, 1989; Menezes, 2006; Sampaio e Costa, 2010) avaliando o grau de rejuvenescimento do material propagativo e o tipo de estacas a se usar.

A importância da folha nas estacas é evidenciada no estudo de Menezes (2006) em que o menor enraizamento foi obtido em estacas de *A. rosaeodora* com menor retenção foliar. Sampaio *et al.* (1989) concluíram que a presença das folhas é determinante para estimular o desenvolvimento radicular e a sobrevivência de estacas da espécie. Estacas sem folhas não enraízam (Sampaio e Costa, 2010).

A propagação por mini-estacas e estacas de material juvenil do pau-rosa independe do uso do regulador de crescimento AIB para o enraizamento, porém, o seu uso pode aumentar a porcentagem de sobrevivência e o número de raízes por estacas (Menezes, 2006; Sampaio e Costa, 2010). Em material adulto, o seu uso pode aumentar a quantidade de raízes emitidas por estacas e tende a elevar o percentual de enraizamento (Menezes, 2006). No entanto, para a mesma espécie *in vitro*, o AIB foi crucial para a emissão da raiz (Jardim *et al.*, 2010), assim como em mini-estacas da *Aniba canellila*, mesmo gênero do pau-rosa (Sampaio *et al.*, 2010). Cavusoglu e Sulusoglu (2014), estudando o efeito de auxinas em *Laurus nobilis* (Lauraceae como o pau-rosa) observou que o sucesso da propagação por estaca depende da variedade da espécie, do tipo e do tratamento com auxina utilizados. Sendo assim, faz-se necessário mais estudo com a auxina, testando diferentes concentrações, reguladores e forma de aplicação para entender a influência da auxina nessa espécie.

3. OBJETIVO

Avaliar o enraizamento de estacas provenientes de rebrotas da cepa de pau-rosa adulto utilizando diferentes substratos, concentrações de auxina e tipos de estaca, bem como descrever o processo histológico da formação das raízes adventícias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As estacas utilizadas para a instalação dos experimentos descritos a seguir foram coletadas em um plantio seminal de pau-rosa com 11 anos de idade pertencente à empresa Magaldi Agrocomercial e Industrial Ltda, município de Maués, situado no extremo leste do Estado do Amazonas, entre os rios Madeira e Tapajós. O clima local é quente e úmido, do tipo “Am” na classificação de Köppen-Geiger (Kotttek *et al.*, 2006), com estação seca de pequena duração. O registro de temperatura média em 2015 foi de 26,6°C, com médias máximas e mínimas entre 27,2°C e 26,0°C (Embrapa, 2016).

O plantio possui 334 árvores em 0,4 ha espaçadas a 3,0 x 4,0 m sobre um Latossolo Vermelho-amarelo Distrófico (Krainovic, 2011). O manejo da área consistiu em dois desbastes seletivos, realizados em março de 2014 e em fevereiro de 2015, e adubação das cepas do último corte (30g/cepa) com cloreto de potássio e sulfato de amônio (1:2) após três meses. Na época dos desbastes os indivíduos já eram adultos, pois já frutificavam. Os ensaios de estaquia foram estabelecidos utilizando as rebrotas provenientes da cepa dessas árvores desbastadas (aproximadamente 35 indivíduos cada um). Em média foram retiradas duas amostras por cepa e o máximo estipulado foram quatro.

Estabelecimento e condução dos experimentos

Para a realização deste estudo, três experimentos foram conduzidos, sendo o primeiro e o terceiro instalados no viveiro da empresa Magaldi Agrocomercial e Industrial Ltda, no município de Maués. O segundo foi instalado na casa de vegetação do Campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, município de Manaus.

Os propágulos foram coletados de materiais vegetais mais vigorosos, sendo as estacas confeccionadas com corte em bisel na base e reto no ápice, comprimento médio de 11 ± 1 cm e um par de folhas reduzidas a 25% da sua área foliar (Figura 4). Durante o processo de preparo, as estacas foram mantidas em baldes com água e ao final, submetidas ao processo de desinfestação em hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) a 0,5% por 10 minutos, sendo em seguida lavadas em água corrente. Após o preparo, as estacas foram plantadas em tubetes (180 cm^3) com 1/3 do seu comprimento enterrado nos devidos substratos.



Figura 4: Ilustração do propágulo coletado e estaca cortada.

Em junho de 2015 foi instalado o primeiro experimento (E1), para o qual se coletou ramos de rebrotas provenientes do segundo desbaste. Após a coleta, realizada nas primeiras

horas da manhã, o material foi transportado para o viveiro da empresa em recipiente com água a fim de evitar a desidratação dos tecidos.

Foram cortadas 480 estacas com diâmetro médio de $5,0 \pm 1,5$ mm, as quais foram tratadas com ácido indolbutírico (AIB) na forma de talco nas concentrações de 0,0; 1,5; 3,0 e 6,0 g Kg⁻¹. O preparo destes tratamentos consistiu na dissolução do AIB em álcool etílico absoluto misturado a talco inerte industrial, sendo que para uma melhor homogeneização, o álcool foi acrescentado até a formação de uma pasta, sendo em seguida transferido para estufa a 35-38°C, onde permaneceu até a completa evaporação do solvente. No tratamento controle foi aplicado o talco sem AIB.

Imediatamente após, as estacas foram plantadas em tubetes contendo como substrato: areia lavada; vermiculita média; areia + vermiculita (1:1, v:v). O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 3 x 4 (substratos e concentrações de AIB), com quatro repetições, 12 tratamentos e 10 estacas por parcela.

No segundo experimento (E2), instalado em novembro de 2015, ramos e rebrotas das cepas do segundo desbaste foram coletados nas primeiras horas da manhã. Devidamente acondicionados em caixas de isopor com folhas de jornal umedecidas, foram encaminhados via fluvial para a Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus. No mesmo dia o material foi armazenado, com a base imersa em água e sob nebulização intermitente, na casa de vegetação da Embrapa até a manhã seguinte, quando os propágulos foram cortados e separados. Sem o uso de reguladores de crescimento, as estacas foram plantadas em tubetes contendo areia lavada e vermiculita de granulometria média (1:1, v:v).

Foram preparadas 240 estacas retiradas das posições apical, intermediária e basal dos ramos das rebrotas, compondo assim três dos tratamentos do E2 (Figura 5A). Cada um desses tratamentos possuíam 20 estacas por parcela, com diâmetro médio de $5,0 \pm 1,7$ mm. O quarto tratamento foi composto por 12 estacas por parcela, com $5,3 \pm 1,9$ mm de diâmetro e retiradas direto das rebrotas emergentes das cepas (48 ao todo), que passa a ser chamado a partir de agora de estacas do tipo “rebrotado”. Esse tratamento consistiu da mistura de mais de uma estaca da mesma rebrota (em sua maioria duas), retiradas obedecendo à divisão apical, intermediária e basal (Figura 5B). Muitas vezes uma das duas últimas posições não estava propícia ao uso por não possuir o número ou o espaçamento entre folhas apropriados. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (apical, intermediária, basal e rebrotado) e quatro repetições.

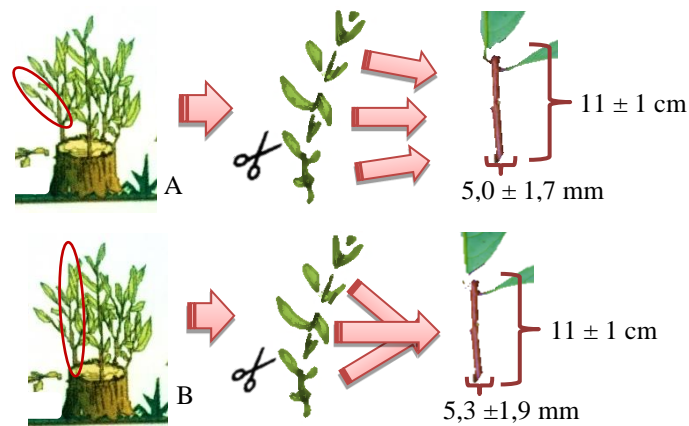


Figura 5: Representação da coleta e confecção dos propágulos: A – estacas obtidas das posições apical, intermediária e basal do ramo das rebrotas de cepas do pau-rosa adulto; B – mais de uma estaca obtida direto da rebrota de cepas que, após misturadas entre si, compoem a parcela do tipo “rebrote” no experimento.

Para o estudo anatômico foi estabelecido um terceiro experimento (E3) em junho de 2015, no viveiro da empresa em Maués. Para tal, foram preparadas 70 estacas com diâmetro médio de $5,0 \pm 1,0$ mm, retiradas da posição intermediária de ramos do terço médio de rebrotas cujas cepas são do primeiro desbaste. Destas, metade foram tratadas com solução hidroalcoólica (50%) de AIB a 3.000 mg L^{-1} , sendo as bases imersas por 10 segundos na solução. O preparo da solução hidroalcoólica consistiu na dissolução do ácido indolbutírico em álcool etílico absoluto, completado com água destilada (1:1) até a obtenção da concentração final desejada.

Imediatamente após o tratamento, as estacas foram plantadas em bandejas plásticas (60 x 41 x 18 cm) com 16 furos e espaçadas 6,0 x 6,0 cm, tendo como substrato areia lavada e vermiculita média (1:1, v:v).

O viveiro onde foram conduzidos os ensaios E1 e E3 (Figura 6A) consistiu em teto e laterais teladas (70% de sombreamento) e irrigação por nebulização das 6 às 18 horas, acionada automaticamente por 2 minutos a cada 12 minutos. A cada 30 dias foram pulverizados fungicida sistêmico Priori® (1 ml L^{-1}), para controle fitossanitário, e adubo foliar Maxiplant® ($0,75 \text{ g L}^{-1}$). A umidade e temperatura (Figura 7) foram acompanhadas com o auxílio de um termohigrômetro instalado junto às bancadas dos experimentos.

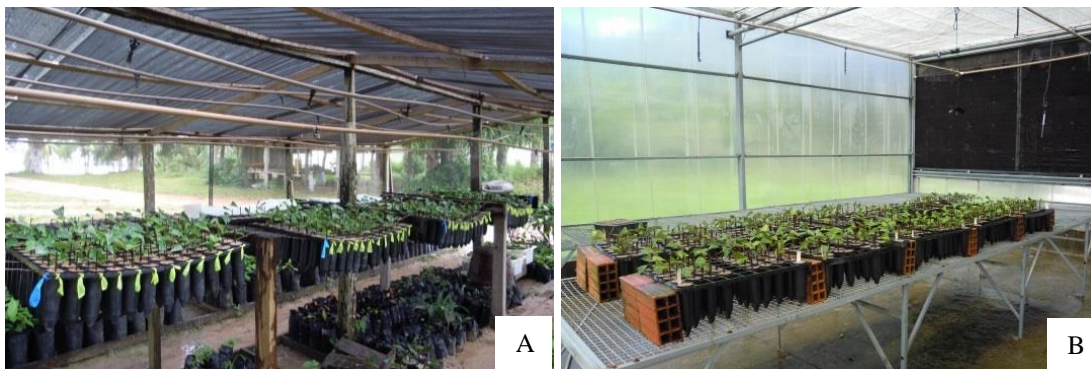


Figura 6: Ambientes de enraizamento: A - viveiro em Maués; B - casa de vegetação da Embrapa em Manaus, Amazonas.

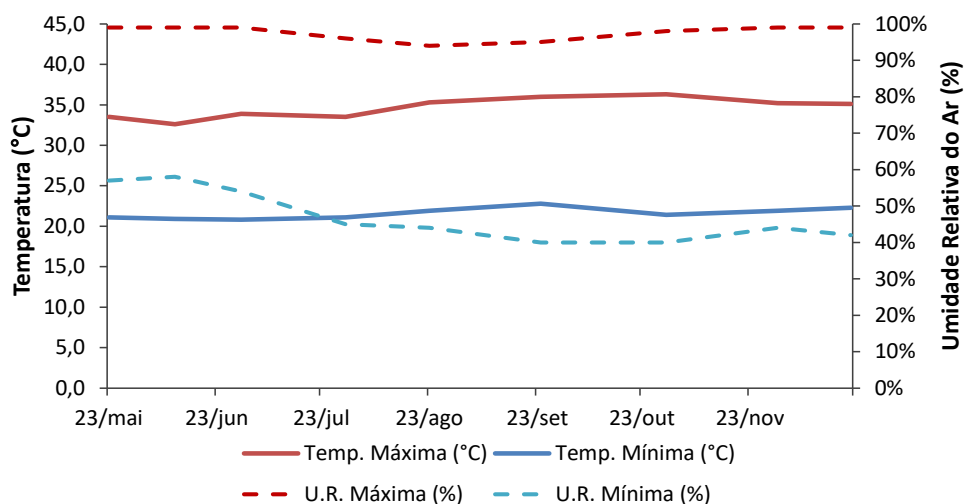


Figura 7: Temperatura e umidade relativa do ar (U.R.) no viveiro em Maués, Amazonas. Máximas e mínimas registradas de maio a novembro de 2015.

O ambiente do ensaio E2 consistiu em casa de vegetação com nebulização intermitente automatizada, temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ e irrigação acionada automaticamente por 1 minuto a cada 11 minutos de intervalo (Figura 6B). Pulverizações semanais com fungicida Cercobin[®] ($0,70 \text{ mg L}^{-1}$) e adubo foliar Forth Enraizador[®] (10 ml L^{-1}) foram realizados.

Ao final de 150 dias no ensaio E1 e 120 dias no E2 foram avaliadas as seguintes variáveis: sobrevivência (%), enraizamento (%), número de raízes adventícias por estaca (quando maior que 3 mm) e comprimento da maior raiz por estaca (cm). No E2, além das variáveis já citadas, foi também avaliado a emissão de brotação (%), o número de brotos e o comprimento do maior broto por estaca (cm) e a presença de calos (%). Tais variáveis não

foram avaliadas no E1 por não ter ocorrido brotações e poucas estacas estarem com calos visíveis (externos).

Determinação do teor de carboidratos

No momento da instalação do E2, sete amostras de 5 cm de comprimento foram retiradas das estacas de cada tratamento, a fim de analisar o teor de carboidratos solúveis e de amido. O material coletado foi congelado em freezer (-18°C) até o momento de sua utilização.

Previamente ao processo de extração, o material vegetal foi seco em estufa a 60°C até se obter peso constante e moído em moinho de bolas até atingir uma granulção fina. No Laboratório de Fisiologia de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental utilizou uma amostra de 200 mg de massa seca (MS), em triplicata, para realizar a extração alcoólica de açúcares segundo o método de Passos (1996): maceração da amostra com etanol 95%, centrifugação (6.000 rpm por 15 min) e obtenção do sobrenadante; seguido de acréscimo de etanol 80% ao sedimento, banho-maria (aproximadamente 30 min), centrifugação (15 min) e combinação do sobrenadante com o anterior. À solução obtida dessa extração, foi misturada 3 ml de clorofórmio e 5 ml de água para remover clorofila e lipídios (Passos, 1996). O sobrenadante teve o volume final registrado e uma alíquota diluída dez vezes para realizar a leitura no espectrofotômetro.

O precipitado resultante foi seco em estufa e utilizado para a extração de amido com o ácido perclórico a 35% (p/v) e centrifugação (15 min a 1.000 g) (Passos, 1996). O sobrenadante teve seu volume registrado e uma alíquota diluída cem vezes para a realização da leitura de absorbância.

As determinações de carboidratos solúveis e amido foram feitas com o reagente de antrona (Passos, 1996, adaptado de Morris, 1948 e Yemm & Willis, 1954). A absorbância foi lida em espectrofotômetro SP 2000 UV a 625 nm, utilizando uma curva padrão de glicose. Os resultados foram expressos em miligrama de glicose e de amido, respectivamente, por grama de massa seca (mg g^{-1} MS).

Análise estatística

Verificou-se a variação dos dados através da análise de variância (ANOVA) pelo teste F (5% de probabilidade) para as variáveis com distribuição normal e através do teste Kruskal Wallis, para as variáveis sem distribuição normal (número de brotos, enraizadas, número de

raízes principais e comprimento da maior raiz do E1). A comparação das médias foi realizada pelo teste Tukey a nível de 5% de significância.

Para verificar a influência entre brotação (%), emissão de calo (%) e enraizamento (%) nas estacas; e das concentrações de carboidratos solúveis (mg g^{-1}) e amido (mg g^{-1}) na sobrevivência (%), brotação (%) e enraizamento (%), realizou-se o teste de correlação de Pearson.

Antes de efetuar as análises, os resultados em porcentagem (sobrevivência, brotação e enraizamento) foram transformados para $\text{arc sen } \sqrt{\frac{x}{100}}$. Os referentes à contagem foram transformados em \sqrt{X} .

Análise histológica

No momento da instalação do E3 foram coletadas amostras de 2 cm da base de quatro estacas como testemunha, tempo zero (t_0). No decorrer do experimento, quatro estacas aleatórias foram coletadas em cada grupo (com e sem o uso do AIB) nos períodos (t) de 7, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias pós-estaqueamento, totalizando 8 amostras por período. As amostras foram fixadas em FAA_{70%} por 96 horas (Johansen, 1940) e armazenadas em álcool etílico 70% (v/v) até o momento de sua utilização.

No Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, as amostras foram seccionadas em três subamostras, das quais pelo menos uma foi ainda seccionada longitudinalmente ao meio para realizar cortes radiais (Figura 8). Após uma série etílica de desidratação a vácuo (2 horas cada) e posterior pré-infiltração por dois dias (vácuo de 2 horas/dia), as porções foram imersas em solução infiltração. Ao fim de um mês, as amostras foram incluídas em historesina (GMA-glicol metacrilato) (Feder e O'Brien, 1968).

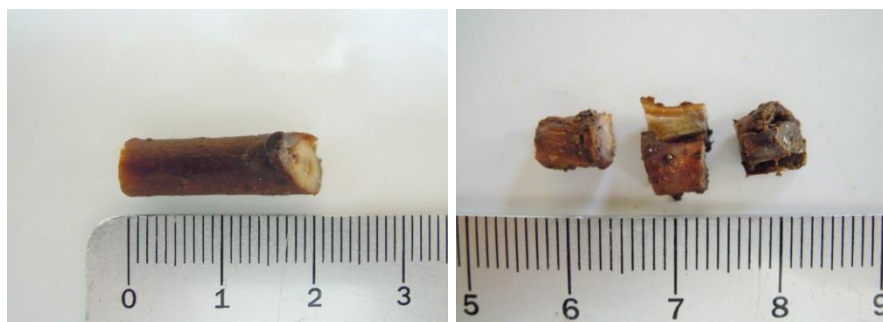


Figura 8: Amostra da base da estaca do pau-rosa para análise anatômica, seccionada em três subamostras, com uma destas seccionada longitudinalmente ao meio.

Seções histológicas com 6 μm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo automático e coradas com azul de toluidina 1%. Lâminas permanentes foram montadas e observadas com o auxílio de microscópio óptico.

Alguns cortes foram submetidos a testes histoquímicos com lugol a 0,5% para a identificação de grãos de amido, e cloreto férrico, para a identificação de compostos fenólicos.

5. RESULTADOS

No experimento 1 (E1) não foi observado efeito de interação entre substrato e concentração do regulador de crescimento para as variáveis avaliadas. Separadamente, os substratos apresentaram diferenças significativas para porcentagem de sobrevivência ($P = 0,0052$) e de enraizamento das estacas ($P = 0,0088$), enquanto as concentrações de AIB proporcionaram diferenças apenas para enraizamento ($P = 0,0292$) (Tabela 2).

Tabela 2: Valores médios de porcentagem de sobrevivência (PEV), porcentagem de enraizamento (PER), número de raízes por estaca (NR) e comprimento da maior raiz por estaca (CMR) com base nos tipos de substrato e nas concentrações do AIB

Fatores	PEV (%)	PER (%)	NR	CMR (cm)
Substrato				
Areia	69,4 ^b	5,6 ^b	0,8	1,0
Vermiculita	83,8 ^a	16,9 ^a	1,5	2,5
Areia + Vermiculita (1:1)	73,8 ^b	12,5 ^{ab}	1,0	1,8
Concentração de AIB (mg g⁻¹)				
0,0	75,8	5,0 ^b	0,7	1,3
1,5	75,0	10,8 ^{ab}	0,8	1,5
3,0	72,5	16,7 ^a	1,5	2,5
6,0	79,2	14,2 ^{ab}	1,6	1,8
Média geral	75,6	11,7	1,1	1,8
CV (%)	17,3	67,6	73,8	108,6

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

De modo geral, a vermiculita se mostrou mais eficiente dentre os demais substratos, com 83,8% e 16,9% de sobrevivência e enraizamento respectivamente. Apesar de possuir o maior valor para o comprimento da maior raiz, a concentração de 3,0 mg kg⁻¹ de AIB diferiu apenas do tratamento controle devido a maior porcentagem de estacas enraizadas (16,7%). Quanto ao número de raízes por estaca, as maiores médias foram obtidas nas duas maiores concentrações de AIB (Tabela 2).

Embora não tenha ocorrido interação entre os fatores, foi observada uma tendência do uso do AIB aumentar o enraizamento das estacas que estavam nos substratos vermiculita e vermiculita + areia (Figura 9).

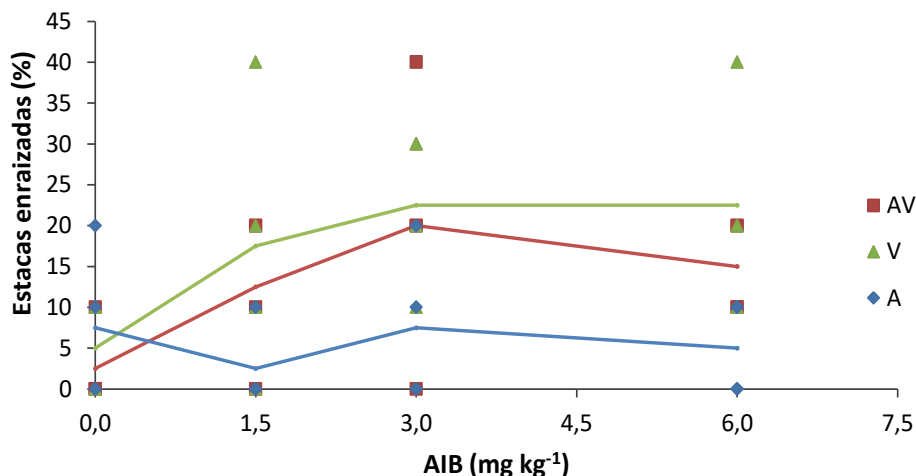


Figura 9: Porcentagem média de estacas enraizadas em areia (A), vermiculita (V) e areia + vermiculita (AV) em função das concentrações do AIB. Os pontos no gráfico representam os pontos médios de cada substrato nos quatro blocos.

No experimento 2, houve diferença significativa entre os tipos de estaca somente para as variáveis porcentagem de estacas com brotos ($P = 0,0003$) e com calos ($P = 0,0129$) (Figura 10). Dentre os tratamentos, o rebroto teve os maiores valores para todas as variáveis analisadas, exceto sobrevivência, onde possui a menor média (62,5%).

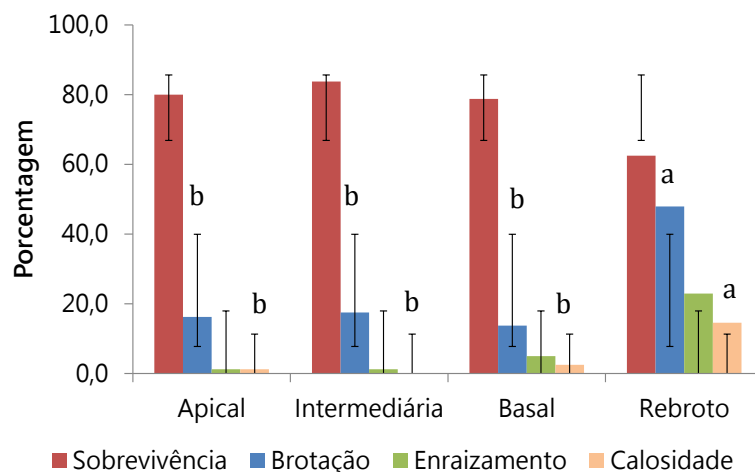


Figura 10: Porcentagem de estacas vivas, com brotos, enraizadas e com calos em cada um dos tipos de estacas e seus respectivos desvios padrão (barras finas). Para letras iguais na mesma variável, não há diferença significativa entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

O percentual geral de sobrevivência foi considerado satisfatório, variando de 62,5% a 83,8%, no entanto, os valores de enraizamento são considerados baixos, com uma média de 7,6%.

Ao contrário do E1, no E2 houve emissão de brotações nas estacas, visíveis já no primeiro mês. Este fato parece não ter inibido o enraizamento dos propágulos ao competir por suprimento, visto que houve uma correlação positiva e significativa de 58,2% ($P = 0,0179$) entre as emissões de brotos e as emissões de raízes. A correlação também foi positiva entre a brotação e a porcentagem de calo (78,8%, $P = 0,0003$) e entre a presença de calos e o enraizamento (72,2%, $P = 0,0016$) (Figura 11).

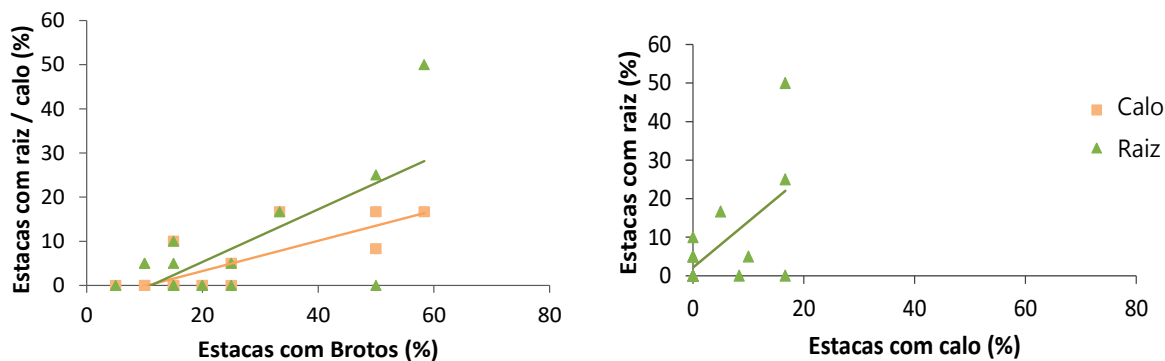


Figura 11: Correlação de Pearson entre as porcentagens de estacas com brotos e estacas enraizadas e com calo; e entre as porcentagens de estacas com calo e estacas enraizadas. As retas evidenciam a correlação dos pontos.

Não foi observado diferenças entre os teores de carboidratos solúveis para os tipos de estaca. No entanto, amido e carboidratos totais apresentaram diferenças significativas, com o tipo basal diferindo das demais estacas ao possuir o menor teor em ambos, 28,6 mg g⁻¹ de MS ($P = 0,0249$) e 85,99 mg g⁻¹ de MS ($P = 0,0752$) respectivamente (Figura 12).

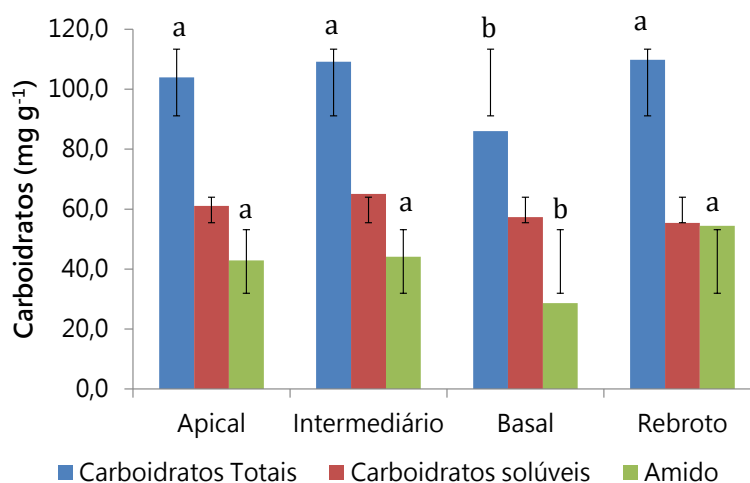


Figura 12: Teores de carboidratos (mg g⁻¹ de massa seca) em função do tipo de estaca e seus respectivos desvios padrão (barras finas). Para letras iguais na mesma variável, não há diferença significativa entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Os valores de carboidratos solúveis tiveram correlação positiva e significativamente com a sobrevivência das estacas (57,9%, $P = 0,0483$). Os teores de amido correlacionaram positivamente ($P = 0,0229$) com a emissão de brotos (64,7%). Já a porcentagem de enraizamento não correlacionou com nenhuma das variáveis (Figura 13).

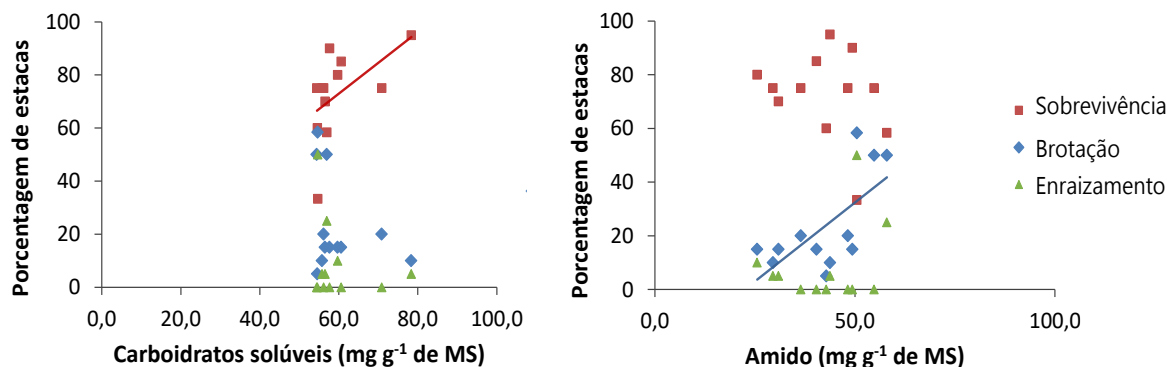


Figura 13: Correlação de Pearson das porcentagens de estacas vivas, com brotos e enraizadas com os teores de Carboidratos solúveis e Amido. As retas evidenciam os pontos nos quais houve correlação.

Análise histológica

Os cortes histológicos evidenciaram o crescimento secundário nas estacas e a presença de esclerênquimas em formato de um anel contínuo (fibras e esclereídes), entre floema e córtex, e solitárias ou em grupos, no córtex e medula (Figura 14A). Aos 7 dias pós-estaqueamento mudanças morfológicas não foram evidenciadas. À nível anatômico, foi possível encontrar divisões celulares na periderme, divisões anticlinais no raio do floema, e periclinais no câmbio vascular.

Aos 15 dias ocorreu mudança na coloração da base da estaca e a formação de novas células devido à atividade do câmbio vascular. Houve formação de um tecido parenquimático desorganizado na periderme e a evidência de lenticelas com tecido de enchimento (Figura 14B). Com 30 dias as divisões se intensificaram, ficando visível a formação de um tecido parenquimático na região do xilema. As mitoses cambiais também derivaram novas células no floema (Figura 14C).

Aos 45 dias observou-se uma intensa multiplicação celular, sendo um tecido rico em mucilagens e pectinas formado na região do câmbio. Esse tecido engloba partes do novo tecido xilemático e se mistura com o floema, espalha-se sob o anel esclerenquimático até conseguir romper a periderme. Com isso ocorre o aumento pontual do diâmetro da base da estaca e, em

muitos casos, conseqüente desprendimento da casca. Nele há a formação de núcleos meristemáticos, com o parênquima xilemático muitas vezes ao centro, e de núcleos esclerenquimáticos, composto por células meristemáticas em volta dos feixes de esclerênquima (Figura 14D).

Com 60 dias, observou-se um maior número de núcleos meristemáticos e a presença de núcleos vasculares e primórdios radiculares (Figura 14E). Aos 90 dias são visualizadas as primeiras raízes que têm origem no tecido parenquimático do xilema formado devido à atividade cambial (Figura 14F).

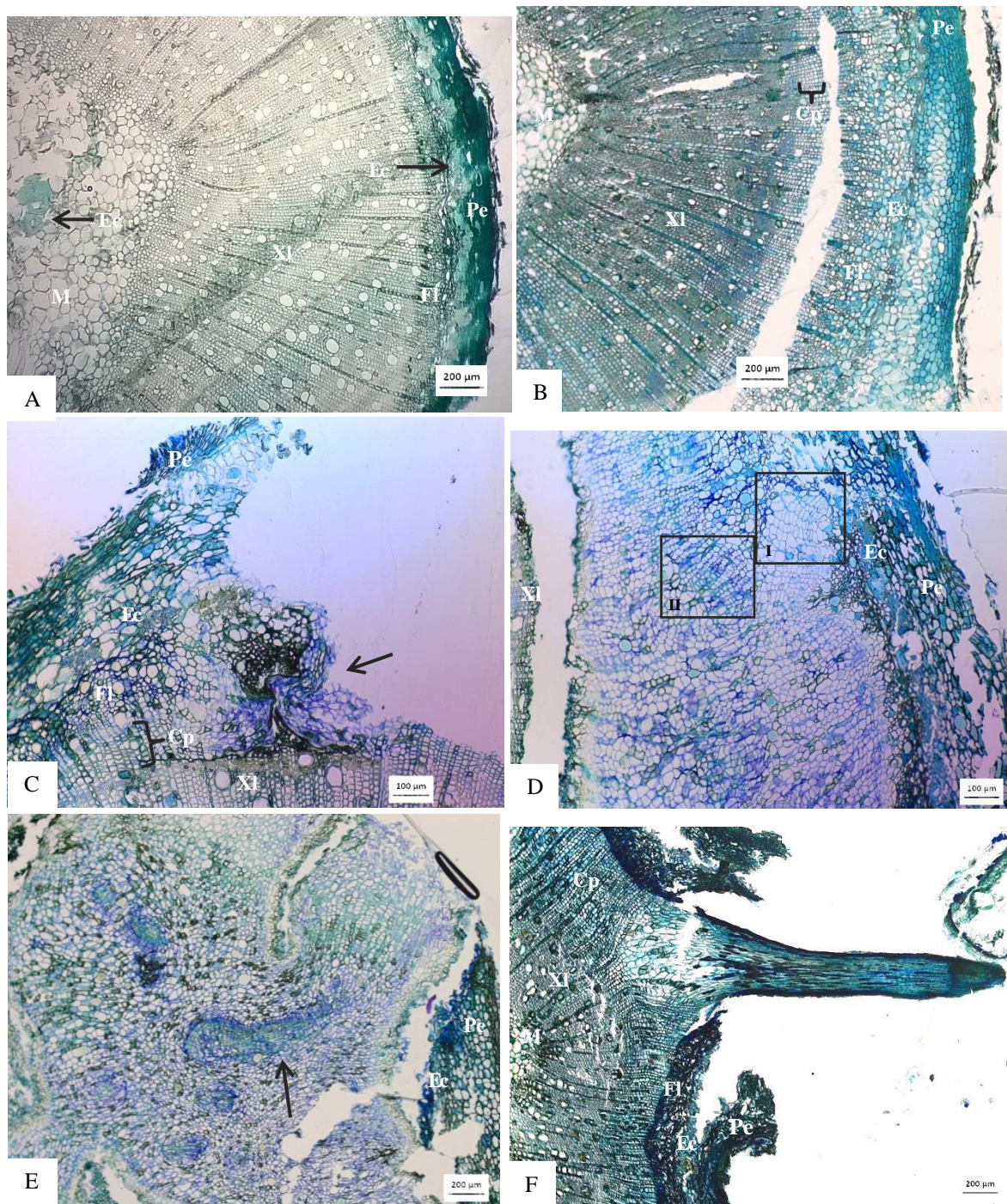


Figura 14: Secções transversais da base da estaca do pau-rosa aos 0, 15, 30, 45, 60 e 90 dias após o estaqueamento, onde: A (0 dias) - Evidência do crescimento secundário nas estacas e presença de esclerênquima em forma de anel contínuo e agrupada (setas); B (15 dias) – Corte mostrando novas células derivadas do câmbio vascular (colchete) e formação de um tecido parenquimático desorganizado na periderme; C (30 dias) – Formação do parênquima xilemático derivado do câmbio (colchete) e início da formação do tecido rico em mucilagens e pectinas (seta); D (45 dias) – Tecido com mucilagens e pectinas despreendendo a casca. Detalhe do grupo de células iniciais (I) e do núcleo meristemático (II); E (60 dias) – Desenvolvimento de

primórdio radicular (seta) a partir da proliferação parenquimática, resultante da atividade do câmbio vascular, com alguns núcleos vasculares ao redor; F (90 dias) – Desenvolvimento da raiz adventícia a partir do tecido parenquimático do xilema, resultante das divisões celulares do câmbio vascular. M = Medula, XI = xilema secundário, Fl = floema, Cp = células parenquimáticas, Ec = esclerênquimas (feixes e/ou esclereides), Pe = periderme.

Os testes histoquímicos permitiram observar a presença de grãos de amido em grandes quantidades nos cortes histológicos de estacas com 7 dias de plantio, não ocorrendo nos demais tempos (Figura 15 A e B). Estes corpos de amido se concentraram na região da medula, próximo ao xilema, e nos raios do xilema. Os compostos fenólicos ficaram evidentes a partir do 45° dia, estando presentes nos raios do xilema e espalhados no calo e massa de células em diferenciação (Figura 15 C e D).

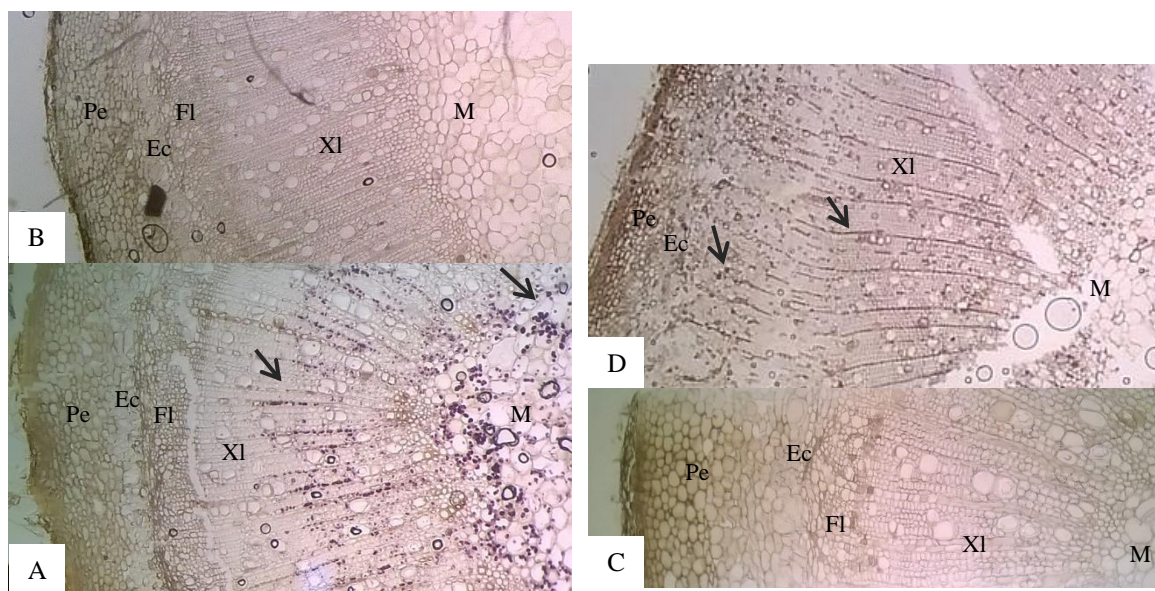


Figura 15: Testes histoquímicos: A (7 dias) e B (15 dias) – teste com Lugol para verificar a presença de grãos de amido (setas); C (15 dias) e D (45 dias) – teste com Cloreto Férrico para verificar a presença de compostos fenólicos (setas).

6. DISCUSSÃO

Dentre os três tipos de substratos, a vermiculita foi a que apresentou o melhor resultado para sobrevivência (83,8%) e enraizamento (16,9%) das estacas, seguido da mistura areia + vermiculita (1:1). A areia foi o de pior desempenho (Tabela 2). Acredita-se que esses resultados estejam associados principalmente à capacidade de retenção da água, uma vez que no momento

da avaliação do experimento foi observada maior umidade nos substratos das estacas enraizadas, especialmente naquelas com maior número e comprimento de raiz. Esse fato aconteceu principalmente nos substratos com vermiculita.

Corroborando com isso Sampaio e Costa (2010), ao compararem a influência de substratos na estaquia de pau-rosa de material juvenil, observaram que o substrato composto de vermiculita e casca de arroz carbonizada se destacou quanto à sobrevivência, enraizamento e formação de calos, quando comparado com o composto de areia e plantmax. Os autores atribuíram esse resultado à boa capacidade de retenção de água, maior espaço poroso e menor densidade existente no substrato superior.

Ao testar diferentes substratos para o enraizamento de estacas lenhosas do pessegueiro cv. Okinawa, Tofanelli *et al.* (2003) atribuíram ao melhor resultado da vermiculita, o bom equilíbrio da relação água/ar. Mendonça *et al.* (2010), estudando o melhor substrato para enraizar estacas lenhosas do ramo de amoreira, observaram que, para sobrevivência e enraizamento, a areia possuiu os piores resultados. Na análise das propriedades físicas feita pelos autores, a areia teve a menor porosidade de preenchimento por água e a maior densidade, além de estar entre os de menor porosidade de aeração.

Um bom substrato tem aeração suficiente para a oxigenação dos tecidos e umidade favorável ao desenvolvimento e crescimento do sistema radicular (Xavier *et al.* 2013). A alta capacidade de drenagem e a maior densidade, que pode ter favorecido a uma maior compactação ao encher os tubetes, podem ter sido os responsáveis pelo pior desempenho da areia neste estudo. A compactação quando excessiva dificulta a formação de raízes e impede a drenagem da água, que pode promover asfixia ou o envelhecimento da raiz quando acumulada, porém quando baixa permite espaços vazios no recipiente que podem oxidar a base da estaca e promover a má formação das raízes (Alfenas *et al.*, 2009).

A influência do substrato depende das condições de enraizamento, da espécie propagada e da variável analisada (Wendling *et al.*, 2007). O fato de um substrato não ter resultado satisfatório, não indica que o mesmo não possa favorecer outra variável em outras condições de enraizamento. Além do mais, eles podem ser combinados integrando suas características físicas para formar um composto mais apropriado.

Neste estudo, as diferentes concentrações do AIB não alteraram significativamente o efeito dos substratos. No entanto, a auxina analisada isoladamente influenciou o enraizamento das estacas, proporcionando um aumento das variáveis relacionadas à raiz (enraizamento, número e comprimento de raiz) até a concentração de 3,0 mg kg⁻¹, a partir da qual diminuiram

(Figura 9). Para a porcentagem de enraizamento, esse leve aumento (16,7%) diferiu significativamente do controle (5,0%), indicando que o regulador influenciou essa variável a um melhor resultado.

A mesma tendência de crescimento e posterior queda foi observada por Menezes (2006) para o enraizamento de estacas de mudas seminais da mesma espécie, mas sem diferença estatística entre as médias. Segundo Dias *et al.* (2012) a auxina pode influenciar o enraizamento de diversas espécies desde que se alcance o balanço hormonal ótimo nos tecidos. Se for além, pode causar o efeito contrário e promover fitotoxicidez (Xavier *et al.*, 2013; Wendling *et al.*, 2015). Das três fases que compõem o processo de enraizamento – indução, iniciação e expressão ou alongação – as duas primeiras são dependentes da presença da auxina, já na última, o crescimento do primórdio pode ser inibido pela presença de substâncias dessa classe (Souza e Pereira, 2007; Xavier *et al.*, 2009).

Na literatura alguns autores não encontraram relação entre o enraizamento de estacas e mini-estacas da *A. rosaeodora* com o uso do AIB líquido, mas a sua presença aumentou a porcentagem de sobrevivência das estacas e o número de raízes emitidas (Menezes, 2006; Sampaio e Costa, 2010). Já na formação de raízes em explantes de plântulas da mesma espécie, o uso do regulador AIB foi crucial para o processo de indução (Jardim *et al.*, 2010). Também em mini-estaca de mudas da *Aniba canellila* o uso dessa mesma auxina fez diferença na emissão, número e comprimento das raízes (Sampaio *et al.*, 2010). Tais resultados corroboram com o deste experimento uma vez que a necessidade do uso do AIB pode variar com a posição de coleta de estaca (Hernández *et al.*, 2012), época de coleta, grau de juvenilidade e cultivares utilizadas (Cavusoglu *et al.*, 2014).

A diferença no efeito do uso do AIB neste estudo e o apresentado por Sampaio *et al.* (1989), Menezes (2006) e Sampaio & Costa (2010), pode estar na forma de aplicação. Esses autores utilizaram a via líquida, enquanto neste estudo o regulador foi veiculado via talco. A aplicação de AIB em pó em *Annona squamosa* foi 20% mais eficiente do que a líquida, podendo essa eficiência estar ligada ao contato mais longo e moderado do material com a auxina (Salvador *et al.*, 2014).

No formato sólido, a substância adere à base da estaca mantendo o tecido vegetal em contato por mais tempo com o regulador e permitindo uma absorção gradual. Testando as duas vias de aplicação em *Psidium guajava*, Yamamoto *et al.* (2010) observou que o AIB via talco possibilita um maior comprimento de raiz, resultando em um enraizamento satisfatório, além de proporcionar menos risco de toxidez, maior praticidade e menor custo na aplicação.

Neste estudo com o pau-rosa, o uso da via talco possibilitou uma diferença do maior enraizamento em relação ao controle de 11,7% (Tabela 2). Ainda assim tal resultado não é satisfatório, principalmente ao levar em conta o custo/benefício do uso da auxina, mas deixa margem para que mais estudos sejam realizados.

Embora tenha ocorrido diferença significativa, os valores médios de enraizamento dentro de cada um dos fatores (substratos e concentrações de AIB) são considerados baixos, sendo a média geral de estacas enraizadas 11,7% para 75,6% de estacas vivas. Esse baixo desempenho pode ter relação com a variação das condições ambientais externas (ventos e dias de muito sol) influenciando o viveiro durante a condução do E1. A amplitude térmica média registrada dentro do viveiro foi de 13,4°C e a umidade relativa do ar mínima chegou aos 40% nos meses de outubro e novembro (Figura 7), no quarto e quinto mês do experimento.

A temperatura está diretamente ligada ao metabolismo das estacas (Rasmussen *et al.*, 2009) e a umidade do ambiente tem a função de manter a turgidez dos tecidos até a formação das raízes (Xavier *et al.*, 2013). As grandes oscilações de temperatura e os baixos valores de umidade podem ter interferido na síntese de substâncias promotoras do enraizamento e/ou provocado desidratação do material vegetal. Aliado ainda a alta variabilidade genética (uso aproximado de 35 matrizes) e a significativas diferenças entre blocos para a porcentagem de enraizamento ($P = 0,0467$) e comprimento da maior raiz ($P = 0,0220$), tal situação favoreceu a alta variedade dos dados.

No experimento 2, o melhor resultado das estacas do tipo rebroto em quase todas as variáveis analisadas, seguida das estacas da posição basal dos ramos, pode estar ligado ao gradiente de juvenilidade. Hartmann *et al.* (2011) afirmam que quanto mais próximo da base da árvore, maior a capacidade do material vegetal enraizar e que, dependendo da espécie, esse gradiente pode ser mais ou menos acentuado. Os rebrotos estão mais próximos da base uma vez que saem diretamente da cepa, enquanto que os demais propágulos foram retirados de ramos de rebrotas, fato que pode justificar uma possível aptidão maior dos primeiros à diferenciação celular.

Neste estudo, o tipo de estaca que teve os maiores valores para a porcentagem de brotação, calo e, apesar de não diferir estatisticamente, de enraizamento, foi o rebroto (Figura 10), que também possuiu maior concentração média de amido (54,4 mg g⁻¹ de MS) (Figura 12). Bhardwai e Mishra (2005) atribuíram a melhor eficiência de propágulos da parte inferior de brotos de *Ulmus villosa* em relação à parte superior, às diferenças no nível de reservas. Contudo,

o tipo rebroto foi o de menor teor para carboidratos solúveis (55,4 mg g⁻¹ de MS), correspondendo também com o tipo de propágulo de menor sobrevivência.

O fato dos carboidratos solúveis serem uma fonte de energia rápida e o aumento da temperatura acelerar a respiração demandando mais energia, pode ter levado ao consumo acelerado da reserva das estacas (Rasmussen *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2012) antes que o amido fosse quebrado em moléculas menores aptas para consumo. A possível falta de energia livre para suprir a demanda metabólica pode justificar a maior mortalidade dessas estacas.

Em geral, as concentrações de amido correlacionaram positivamente com a porcentagem de estacas com brotos (64,7%, $P = 0,0229$) e as concentrações de carboidratos solúveis, com a porcentagem de estacas vivas (57,9%, $P = 0,0483$) (Figura 13). Oliveira *et al.* (2012), estudando o teor de carboidrato durante o enraizamento do mirtilheiro, observou que o período durante a emissão de brotos e raízes está relacionado com um maior consumo das reservas. Os mesmos autores explicam que há uma mobilização das reservas para as gemas em desenvolvimento, que atuam como dreno. Possivelmente a relação das reservas com o enraizamento não foram aqui percebidos devido à baixa porcentagem de enraizamento que proporcionou um número pequeno de amostras para que a relação pudesse ser notada.

Mesmo atuando como um dreno, a correlação da emissão de brotos foi positiva em relação ao enraizamento (58,2%, $P = 0,0179$) (Figura 11), revelando que um não interferiu na emissão do outro. As auxinas endógenas e os cofatores do enraizamento são produzidas nas gemas e partes novas da planta (Souza *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2011). O broto em desenvolvimento pode ter fornecido essas substâncias, favorecendo a emissão da raiz a tal ponto que a competição por carboidrato não foi expressiva.

O baixo porcentual de enraizamento (7,6%) e a emissão de brotos (23,9%) nas estacas da casa de vegetação (Figura 10), pode ser reflexo da elevada umidade do ar associada à temperatura de 30°C. As condições ambientais do lugar fechado promoveram uma alta umidade relativa do ar que pode ter desencadeado a quebra de dormência das gemas, estimulando a brotação. A menor temperatura do substrato em relação à do ar, que proporciona diferença térmica entre base e ápice da estaca, pode ter aumentado a transpiração da parte aérea resultando em maior atividade metabólica, o que causa maior fluxo de substâncias nessa direção, tornando-a dreno preferencial (Oliveira *et al.*, 2012). Um balanço hormonal na relação auxina/citocinina pode ter ocorrido a favor da brotação. Segundo Xavier *et al.* (2013) a emissão de brotações é favorecida pela sua baixa proporção, enquanto a alta, ou seja, mais auxina do que citocinina,

favorece o enraizamento. Além do mais, neste experimento não foi utilizado regulador de crescimento, o que poderia vir a reequilibrar tal relação a favor do enraizamento.

As variações ambientais e as respostas da *A. roaeodora* aqui apresentados evidenciam a necessidade de se estabelecer o microclima ideal para o seu enraizamento. Dias *et al.* (2012) já afirmam que para a propagação ser viável para espécies nativas florestais, os sistemas de condução e manejo do ambiente de propagação é um dos temas que deve ser explorado em pesquisas. Estudos testando temperatura, luminosidade, umidade relativa do ar e umidade do substrato devem ser realizados com o pau-rosa para determinar as técnicas de manejo do ambiente de propagação.

Análise histológica

O processo de formação da raiz aqui observado consistiu na formação de um tecido caloso onde se observou vários centros vasculares de diversos tamanhos, com traqueídes no centro, alguns dos quais se alongavam em direção a extremidade do calo caracterizando o primórdio radicular. Rasmussen *et al.* (2009) atribuem a origem da raiz ao calo e sugerem que a formação dos traqueídes é crucial para haver a formação do primórdio, já que eles não encontraram essa formação em estacas calosas não enraizadas. Porém, no pau-rosa, os traqueídes foram encontrados em indivíduos calosos sem raiz e raiz encontradas em indivíduos sem evidência de calos.

Para a maioria das espécies lenhosas, tidas como de difícil enraizamento, a formação de sua raiz se dá de forma indireta, derivada de calos, enquanto as de fácil enraizamento tem a raiz originada de forma direta, na maioria das vezes, na região do câmbio vascular (Hartmann *et al.*, 2011). Os resultados observados para o pau-rosa demonstram que a formação da raiz não depende do calo, corroborando com o observado por Sampaio *et al.* (1989), pois a formação da raiz partiu das células parenquimáticas formadas no xilema como resultado da divisão do câmbio vascular. De maneira geral observou-se que o calo englobou essas células as quais foram rodeadas por células meristemáticas. Depois de um tempo, só se encontravam os núcleos vasculares, do qual se acredita, em conformidade com Rasmussen *et al.* (2009), que possa derivar primórdios radiculares.

Apesar de não originar a raiz, o calo favoreceu o enraizamento, uma vez que promoveu o desprendimento e/ou rompimento da casca na região do câmbio, o que elimina o esclerênquima e facilita a emissão da raiz. Existem divergências quanto ao tecido esclerenquimático ser um fator limitante ou não ao enraizamento (Davies e Hartmann, 1988).

No entanto, um estudo com estacas lenhosas em espécies florestais nativas relacionou a proporção do tecido esclerenquimático, presente em propágulos de maior diâmetro, com a porcentagem e qualidade do enraizamento, mesmo os esclerênquimas sendo não contínuos (Santos *et al.*, 2011). No mesmo estudo, os autores ainda relacionaram a dificuldade em se cortar as estaca com a ausência de enraizamento. Medrado *et al.* (1995), estudando à nível histológico em seringueira as alterações provocadas pelas técnicas usadas para transpor barreiras anatômica (estiolamento e estrangulamento), concluiu que o estrangulamento induziu uma maior produção de parênquima no floema, resultando no rompimento da barreira.

Acredita-se que o esclerênquima não seja o único fator que dificulta o enraizamento, mas soma-se a fatores bioquímicos e fisiológicos que podem estar atuando. Os grãos de amido não foram encontrados além dos sete dias do estaqueamento, possivelmente porque o amido foi quebrado para suprir a necessidade energética que demanda o desenvolvimento de novas células (Oliveira *et al.*, 2012). A visualização de compostos fenólicos somente após os 45 dias do plantio coincide com a formação da massa calosa de mucilagens e pectinas. Dentre esses compostos existem muitos que atuam como inibidores do processo do enraizamento, porém outros são cofatores essenciais às funções fisiológicas, atuando como indutores e protetores da auxina endógena (Hartman *et al.*, 2011). As primeiras visualizações podem indicar o início do estímulo à formação de primórdios radiculares (Souza e Pereira, 2007).

De um modo geral, houve uma alta variabilidade dos dados nos experimentos aqui avaliados, principalmente no que diz respeito ao enraizamento das estacas. Houve também uma baixa taxa de enraizamento que pode ter sido devido: a variabilidade genética que, tanto no nível de espécie (Santos *et al.*, 2011) quanto de indivíduo (Brondani *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2009), determina a predisposição das células a se diferenciarem *de novo* (Goulart *et al.*, 2014); a produção de substâncias bioquímicas inibidoras do enraizamento (Zuffellato-Ribas e Rodrigues, 2001); as condições ambientais não adequadas (Dias *et al.*, 2012); o anel de esclerênquima, que pode funcionar como barreira mecânica a emissão da raiz (Medrado *et al.*, 1995); e a possibilidade do rejuvenescimento não ter atingido o grau adequado (Wendling e Xavier, 2001).

Os resultados obtidos possibilitaram a produção de mudas de pau-rosa via propagação por estacas, tratadas com 3,0 mg kg⁻¹ de AIB na forma de pó, tendo a vermiculita como substrato e propágulos coletados de rebrotos emitidos da cepa. No entanto, mais estudo são necessários para adequar as condições ambientais, romper a barreira física de esclerênquima, verificar a existência de barreira bioquímica, selecionar indivíduos geneticamente mais aptos ao

enraizamento, enfim, tornar a produção de mudas por estacas mais viável, conciliando assim a produção e conservação da espécie.

7. CONCLUSÃO

A partir das condições experimentais estabelecidas no presente trabalho é possível concluir que:

- A vermiculita foi o substrato que proporcionou a melhor condição para o enraizamento adventício das estacas de pau-rosa.
- O uso do regulador de crescimento AIB a $3,0 \text{ g kg}^{-1}$, veiculado em talco, proporcionou maior porcentagem de enraizamento.
- Propágulos obtidos do rebroto de cepa de pau-rosa adulto apresentaram melhor enraizamento comparado aos demais tipos de estaca
- A raiz da *A. rosaeodora* surge do parênquima do xilema formado devido à atividade cambial. O calo, formado também a partir do câmbio, auxilia na emissão da raiz ao romper o anel de esclerênquima presente na espécie.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas pesquisas ainda têm que ser realizadas até se chegar a um protocolo para o enraizamento de estacas do pau-rosa. Por hora, sugere-se que estudos sejam aprofundados para determinar o microclima do ambiente e a umidade ideal para o substrato; testar metodologias para o preparo de estacas que possam vencer a barreira anatômica; verificar a limitação de cofatores endógenos – inibidores e promotores do processo de enraizamento adventício.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agulló-Antón, M. Á.; Sánchez-Bravo, J.; Acosta, M.; Druege, U. 2011. Auxins or sugars: what makes the difference in the adventitious rooting of stored carnation cuttings?. *Journal of plant growth regulation*, 30(1): 100-113.
- Alencar, J.C.; Fernandes, N. P. 1978. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies, Pau-rosa (*Aniba duckei* Kosterm.). *Acta Amazonica*, 8 (4): 523-541.
- Alfenas, A. C.; Zauza, E. A.; Mafía, R. G.; De Assis, T. F. 2004. Clonagem e doenças do eucalipto.
- Bastos, D. C.; Martins, A. B. G.; Scaloppi Junior, E. J.; Sarzi, I.; Fatinansi, J. C. 2004. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas apicais e basais de caramboleira (*Averrhoa carambola* L.) sob condições de nebulização intermitente. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26 (2): 284-286.
- Baul, T. K.; Hossain, M. M.; Mezbahuddin, M.; Mohiuddin, M. 2011. Vegetative propagation of *Litsea monopetala*, a wild tropical medicinal plant: Effects of indole-3-butyric acid (IBA) on stem cuttings. *Journal of Forestry Research*, 22(3): 409-416.
- Bhardwaj, D. R.; Mishra, V. K. 2005. Vegetative propagation of *Ulmus villosa*: effects of plant growth regulators, collection time, type of donor and position of shoot on adventitious root formation in stem cuttings. *New Forests*, 29(2), 105-116.
- Bitencourt, J.; Zuffellato-Ribas, K. C.; Wendling, I.; Koehler, H. S. 2009. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescentes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 11(3): 277-28.
- Carvalho, J. O. P. 1983. Abundância, frequência e grau de agregação de Pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) na Floresta Nacional do Tapajós. Belém: Embrapa-CPATU, *Boletim de Pesquisa* 53. 18p.
- Cavusoglu, A.; Sulusoglu, M. 2014. Effects of indole-3-butyric acid (IBA) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA) on rooting of female and male *Laurus nobilis* L. cuttings. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 4(11): 206-216.
- CITES - Comércio Internacional de Espécie da Flora e Fauna Selvagens Ameaçadas de Extinção. 2010. Regulamento (UE) n.º 709/2010 da Comissão, de 22 de Julho de 2010, que altera o Regulamento (CE) n.º 338/97 do Conselho relativo à protecção de espécies da fauna e da flora selvagens através do controlo do seu comércio. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 212, p. 1-59.
- CNCFlora - Centro Nacional de Conservação da Flora. *Aniba rosaeodora* Ducke – Lauraceae. *Lista Vermelha*. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br> Acessado em: 20/11/2014
- Cunha, A. C. M. C. M.; Paiva, H. N. D.; Leite, H. G.; Barros, N. F. D.; Leite, F. P. 2009. Relações entre variáveis climáticas com produção e enraizamento de miniestacas de eucalipto. *Revista Árvore*, 33(2): 195-203.
- Davies Jr, F. T.; Hartmann, H. T. 1987. The physiological basis of adventitious root formation. In *International Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species* 227. p. 113-120.
- Dias, P. C.; Oliveira, L. S. De; Xavier, A.; Wendling, I. 2012. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, 32 (72): 453-462.

- Ducke, A. 1938. Lauraceas aromáticas do Amazonas. *Reunião Sul Americana de Botânica* 3. p. 55-74.
- Embrapa Amazônia Ocidental. Dados de climatologia da cidade de Maués durante o ano de 2015. Dados cedidos em 2016.
- Feder, N.; O'Brien, T. P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American journal of Botany*, 123-142.
- Ferrari, M. P.; Grossi, F.; Wendling, I. 2004. *Propagação vegetativa de espécies florestais*. Colombo: Embrapa Florestas. 22 p.
- Gomes, J. M.; Couto, L.; Leite, H. G.; Xavier, A.; Garcia, S. L. R.. 2002. Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, 26 (6), 655-664.
- Goulart, P. B.; Xavier, A.; Otoni, W. C. 2014. Morfoanatomia da rizogênese adventícia em miniestacas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. *Ciência Florestal*, 24(3), 521-532.
- Hartmann, H.T.; Kester, D.E.; Davies Júnior, F.T.; Geneve, R.L. 2011. *Plant propagation: principles and practices*. 8 ed. New York, Englewood Clippis, 880p.
- Hernández, W.; Xavier, A.; de Paiva, H. N.; Wendling, I. 2012. Propagação vegetativa do pau-jacaré (*Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr.) por estaquia. *Revista Árvore*, 36(5): 813-823.
- Hernández, W.; Xavier, A.; Paiva, H. N. de; Wendling, I. 2013. Propagação vegetativa do jequitibá-rosa (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze) por estaquia. *Revista Árvore*, 37 (5): 955-967.
- Higashi, E. N.; Silveira, R. L. V. de A.; Gonçalves, A. N. 2000. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, *Circular técnica IPEF* 192. 12p.
- Homma, A. K. O. 2005. O extrativismo do óleo essencial de pau-rosa na Amazônia. XLIII Congresso Sobre “Instituições, Eficiência, Gestão e Contratos no Sistema Agroindustrial”.
- Ibama - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1992. *Portaria IBAMA Nº 37-N*, de 3 de abril de 1992. Brasília.
- IUCN - Red List of Threatened Species. Version. 2014. Varty, N. 1998. *Aniba rosaeodora*. Disponível em: www.iucnredlist.org Acessado em: 27/09/2014.
- Jardim, L. S., Sampaio, P. D. T. B., COSTA, S. de S.; Blair, C. de Q.; Gonçalves, H. L. M. B. 2010. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Acta Amazonica*, 40(2): 275-280.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 523 p.
- Kottek, M.; Grieser, J.; Beck, C.; Rudolf, B.; Rubel, F. 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*, 15(3), 259-263.
- Krainovic. P.M. 2011. *Plantios de Pau-rosa (Aniba rosaeodora Ducke) em áreas com histórico de degradação por atividades agrícolas e pecuárias*. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia. 122 p.

- Ky-Dembele, C.; Tigabu, M.; Bayala, J.; Savadogo, P.; Boussim, I. J.; Odén, P. C. 2011. Clonal Propagation of *Khaya senegalensis*: The Effects of Stem Length, Leaf Area, Auxins, Smoke Solution, and Stockplant Age. *International Journal of Forestry Research*, 2011.
- Leandro, R. C.; YuYama, K. 2008. Enraizamento de estacas de castanha-de-cutia com uso de ácido indolbutírico. *Acta Amazonica*, 38 (4): 421-430.
- Leite, A. M. C.; Quisen, R. C.; Sampaio, P. T. B. 2001. Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) Lauraceae): informações sobre o sistema de plantio e o manejo sustentável da espécie. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, *Documentos 13*. 20 p.
- Leite, A. M. C.; Sampaio, P. D. T. B.; Barbosa, A. P.; Quisen, R. C. 1999. Diretrizes para o resgate e conservação da variabilidade genética de espécies Amazônicas I – Pau-rosa. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, *Documentos 6*. 43 p.
- Magalhães, L. M. S. De; Alencar, J. C. 1979. Fenologia do pau-rosa (*Aniba dukei* Kostermans), Lauraceae, em floresta primária na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 9 (2): 227-232.
- Medrado, M. J. S.; Appezzato-da-Glória, B.; Costa, J. D. (1995). Alterações anatômicas em estacas de seringueira (*Hevea brasiliensis* clone RRIM 600) em resposta a diferentes técnicas de indução ao enraizamento. *Scientia Agricola*, 52(1).
- Melo, L. A. de; Davide, A. C.; Teixeira, L. A. F. 2012. Metodologia para resgate de matrizes e enraizamento de estacas de *Eremanthus erythropappus*. *Cerne*, 18 (4), 631-638.
- Mendonça, V.; Costa, F. C.; Curi, P. N.; Moura, P. H. A.; Tadeu, M. H. 2010. Substratos no enraizamento de estacas de amoreira (*Morus alba* L.). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 5(3).
- Menezes, A. 2006. *Vegetative propagation of three Amazon species: Rosewood (Aniba rosaeodora Ducke), Copaiba (Copaifera multijuga Hayne) and Breu (Protium apiculatum Swartz)*. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonas/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 83p.
- Negrelle, R.R.B.; Doni, M.E. 2001. Efeito da maturidade dos ramos na formação de mudas de guaco por meio de estaquia. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 19 (3): 219-222.
- Ohashi, S. T.; Rosa, L. dos S. 2004. Pau-rosa – *Aniba rosaeodora* Ducke. *Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia*, (4). 2p.
- Ohashi, S. T.; Rosa, L. dos S.; Mekdece, F. S.. 2004. Influência do diâmetro e da altura de corte das cepas na brotação de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Revista Ciências Agrárias*, Belém, 41: 137-144.
- Oliveira, M. C.; Ribeiro, J. F. 2013. Enraizamento de estacas de *Euplassa inaequalis* (Pohl) Engl. de mata de galeria em diferentes estações do ano. *Bioscience Journal*, 29(4).
- Oliveira, R. J. P. D.; Bianchi, V. J.; Aires, R. F.; Campos, Â. D.. 2012. Teores de carboidratos em estacas lenhosas de mirtilheiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(4), 1199-1207.

- Paiva, H. N. de; Gomes, J. M. 2005. Propagação vegetativa de espécies florestais. Viçosa: Editora UFV, *Caderno didático 83*. 46p.
- Passos, L. P. 1996. *Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal*. Embrapa. Cap. 10. Carboidratos – Análise quantitativa 53-64p.
- Rasmussen, A.; Smith, T. E.; Hunt, M. A. 2009. Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings in different temperature environments. *New Forests*, 38(3), 285-294.
- Salvador, T. D. L.; Salvador, T. D. L.; Lemos, E. E. P. D.; Barros, P. G.; Campos, R. D. S. 2014. Rooting cuttings of sugar apple (*Annona squamosa* L.) with indolebutyric acid. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36 (SPE1), 310-314.
- Sampaio, P. D. T. B.; Costa, S. 2010. Métodos de Propagação Vegetativa do Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): Estacas e mini-estacas. *III Reunião Científica da Rede CTPetro Amazônia – Manaus*, 4-5/11/2010
- Sampaio, P. de T. B.; Siqueira, J. A. S. D.; Costa, S.; Bruno, F. M. S. 2010. Propagação vegetativa por miniestacas de preciosa (*Aniba canellila* (H. B.K) MEZ). *Acta Amazonica*, 40 (4): 687-692.
- Sampaio, P. T. B.; Noda, H.; Parente, R. 1989. Enraizamento de estacas de material juvenil de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke - Lauraceae). *Acta Amazônica*, 19 (1): 391-400.
- Sampaio, P.T.B.; Barbosa, A.P.; Vieira, G.; Spironello, W.R.; Bruno, F.M.S. 2005. Biomassa da rebrota de copas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em plantios sob sombra parcial em floresta primária. *Acta Amazonica*, 35 (4): 491-494.
- Sampaio, P.T.B.; Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C. 2003. Pau-rosa - *Aniba rosaeodora* Ducke – Lauraceae. *Manual de sementes da Amazônia*, (3). 7 p.
- Sampaio, P.T.B.; Santos, M.C.dos; Vieira, G.; Spironello, W.; Useche, F.L.; Bruno, F.M.S. 2007. Avaliação da rebrota da copa das árvores de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em sistema de podas sucessivas. *Acta Amazonica*, 37 (1): 55-60.
- Santos, J. D. P. D.; Davide, A. C.; Teixeira, L. A. F.; Melo, A. J. S.; Melo, L. A. D. 2011. Enraizamento de estacas lenhosas de espécies florestais. *Cerne*, 17, 293-301.
- Silva, F. V. C.; Castro, A. M.; Chagas, E. A.; Pessoni, L. A. 2009. Propagação vegetativa de camu-camu por estaquia: efeito de fitorreguladores e substratos. *Revista Agro@ambiente On-line*, 3 (2): 92-98.
- Souza, A. V.; Pereira, A. 2007. Enraizamento de plantas cultivadas in vitro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 103-116.
- Souza, K.S.; Chaar, J.S.; Oliveira, K.M.T.; Gomes, E.O.; Portela, C.N.; Pohlit, A.M., Quignard, E.L.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P.; Mouchrek Filho, V.E.; Silva, D.D.; Galhiane, M.S.; Chierice, G.O. 2007. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 9 (2): 1-7.

- Spironello, W. R.; Sampaio, P. de T. B.; Ronchi-Teles, B. 2004. Produção e predação de frutos de *Aniba rosaeodora* var. *Amazonica* Ducke (Lauraceae) em sistema de plantio sob floresta de terra firme na Amazônia Central. *Acta Botanica Brasilica*, 18 (4): 801-807.
- Stuepp, C. A.; Wendling, I.; Koehler, H. S.; Zuffellato-Ribas, K. C. 2015. Estaquia de árvores adultas de *Paulownia fortunei* var. *mikado* a partir de brotações epicórmicas de decepta. *Ciência Florestal*, 25(3), 667-677.
- SUDAM - Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia. 1972. Extrativismo do Pau-rosa (*Aniba duckei* Koster., *Aniba rosaeodora* Ducke). Aspectos socioeconômicos: A silvicultura da espécie. *Documentos da Amazônia*, 3 (1/4): 5-55.
- Tofaneli, M. B. D.; Rodrigues, J. D.; Ono, E. O. 2003. Enraizamento de estacas lenhosas de pessegueiro cv. Okinawa em diferentes diâmetros de ramos, substratos e recipientes. *Ciência Rural*, 33(03):437-442.
- Wendling, I., Guastala, D.; Dedecek, R. 2007. Características físicas e químicas de substratos para produção de mudas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Revista Árvore*, 31(02): 209-220.
- Wendling, I.; Brooks, P. R.; Trueman, S. J. 2015. Topophysis in *Corymbia torelliana* × *C. citriodora* seedlings: adventitious rooting capacity, stem anatomy, and auxin and abscisic acid concentrations. *New forests*, 46(1):107-120.
- Wendling, I.; Trueman, S. J.; Xavier, A. 2014a. Maturation and related aspects in clonal forestry – Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. *New Forests*, 45: 449-471.
- Wendling, I.; Trueman, S. J.; Xavier, A. 2014b. Maturation and related aspects in clonal forestry – Part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests*, 45(4): 473-486.
- Wendling, I.; Xavier, A. 2001. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. *Floresta e Ambiente*, 8 (1):187-194.
- Xavier, A.; Santos, G. D.; Wendling, I.; Oliveira, M. D. 2003. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. *Revista Árvore*, 27 (2): 139-143.
- Xavier, A.; Wendling, I.; Silva, R. L.. Silvicultura clonal: princípios e técnicas. 2. ed., Viçosa: Ed. UFV. 2013. 279 p
- Yamamoto, L. Y.; Borges, R. D. S.; Sorace, M.; Rachid, B. F.; Ruas, J. M. F.; Sato, O.; Assis, A. M.; Roberto, S. R. 2010. Enraizamento de estacas de *Psidium guajava* L. 'Século XXI' tratadas com ácido indolbutírico veiculado em talco e em álcool. *Ciência Rural*, 40(5).
- Zuffellato-Ribas, K. C.; Rodrigues, J. D. 2001. *Estaquia: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos*. Curitiba, 2001.

APÊNDICE A – Quadros resumo das análises de variância (ANOVA)

Tabela 3: Quadro resumo do Teste F para porcentagem de sobrevivência (PEV) e enraizamento (PER), número de raiz/estaca (NR) e comprimento da maior raiz em centímetros (CMR) em estacas de rebrota da cepa de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) adulto (experimento 1), testando substrato e concentrações do ácido indolbutírico (AIB)

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		PEV	PER	NR	CMR
Bloco	3	0,052 ^{ns}	0,103*	0,569 ^{ns}	13,546*
Substrato	2	0,220**	0,192**	1,003 ^{ns}	9,687 ^{ns}
AIB	3	0,0010 ^{ns}	0,119*	0,950 ^{ns}	3,020 ^{ns}
Substrato*AIB	6	0,033 ^{ns}	0,038 ^{ns}	0,430 ^{ns}	6,632 ^{ns}
Resíduo	33	0,035	0,035	0,375	3,697
Total	47				
CV (%)		18,9	99,0	101,6	125,1

* p > 0,05; ** p > 0,01; CV – coeficiente de variação; GL – grau de liberdade

Tabela 4: Quadro resumo do Teste F (quadrado médio) e Teste Kruskal-Wilis (Qui-quadrado) para porcentagem de sobrevivência (PEV), porcentagem de brotação (PEB), número de broto por estaca (NB) e comprimento do maior broto em centímetros (CMB), porcentagem de calo (PEC), porcentagem de enraizamento (PER), número de raiz por estaca (NR) e comprimento da maior raiz em centímetros (CMR) em estacas de rebrota da cepa de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) adulto (experimento 2), testando tipo de estaca

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			Qui-quadrado				
		PEV	PEB	CMB	NB	PEC	PER	NR	CMR
Tipo de estaca	3	0,048 ^{ns}	0,132**	0,380 ^{ns}	4,146 ^{ns}	10,795*	5,894 ^{ns}	5,894 ^{ns}	5,704 ^{ns}
Resíduo	12	0,032	0,009	0,236	-	-	-	-	-
Total	15								
CV (%)		20,6	66,8	28,0	36,7	148,2	175,7	132,5	181,9

* p > 0,05; ** p > 0,01; CV – coeficiente de variação; GL – grau de liberdade.

Tabela 5: Quadro resumo do Teste F (quadrado médio) e Teste Kruskal-Wilis (Qui-quadrado) para os teores de Carboidratos Solúveis, Amido e Totais dados em mg g⁻¹ de massa seca presentes em diferentes tipos de estacas da rebrota da cepa de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) adulto (experimento 2)

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		Qui-quadrado
		Carb. Totais	Amido	Carb. Solúveis
Tipo de estaca	3	6,897*	9,359*	3,359 ^{ns}
Resíduo	8	46,55	19,76	-
Total	11			
CV(%)		11,4	24,2	12,4

* p > 0,05; ** p > 0,01; CV – coeficiente de variação; GL – grau de liberdade.

APÊNDICE B – Boxplot das variáveis respostas para AIB e substrato

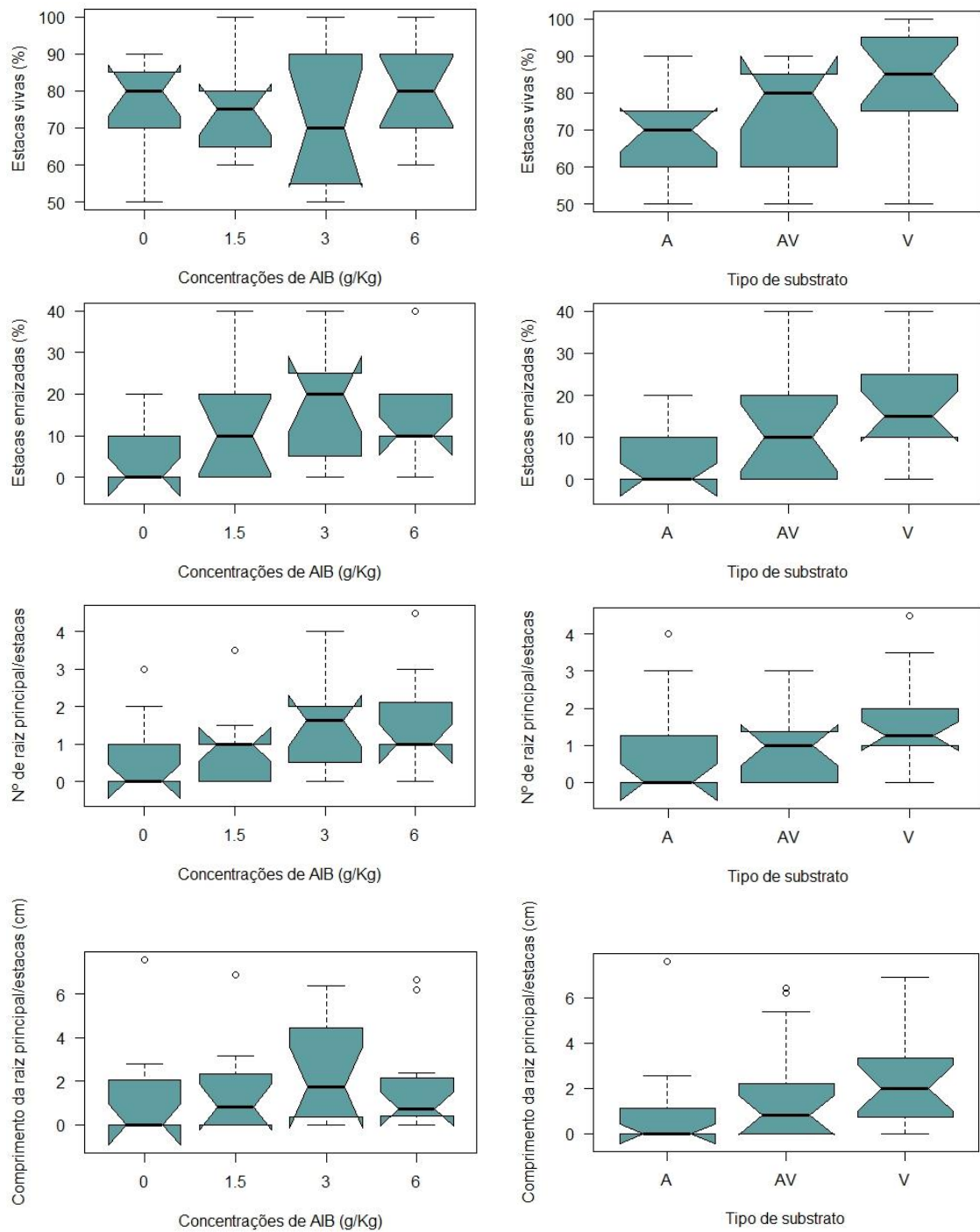


Figura 16: Boxplot das variáveis em função dos substratos (areia [A], vermiculita [V] e areia + vermiculita [AV]) e das concentrações de AIB (experimento 1).

APÊNDICE C – Boxplot das variáveis respostas para tipo de estaca

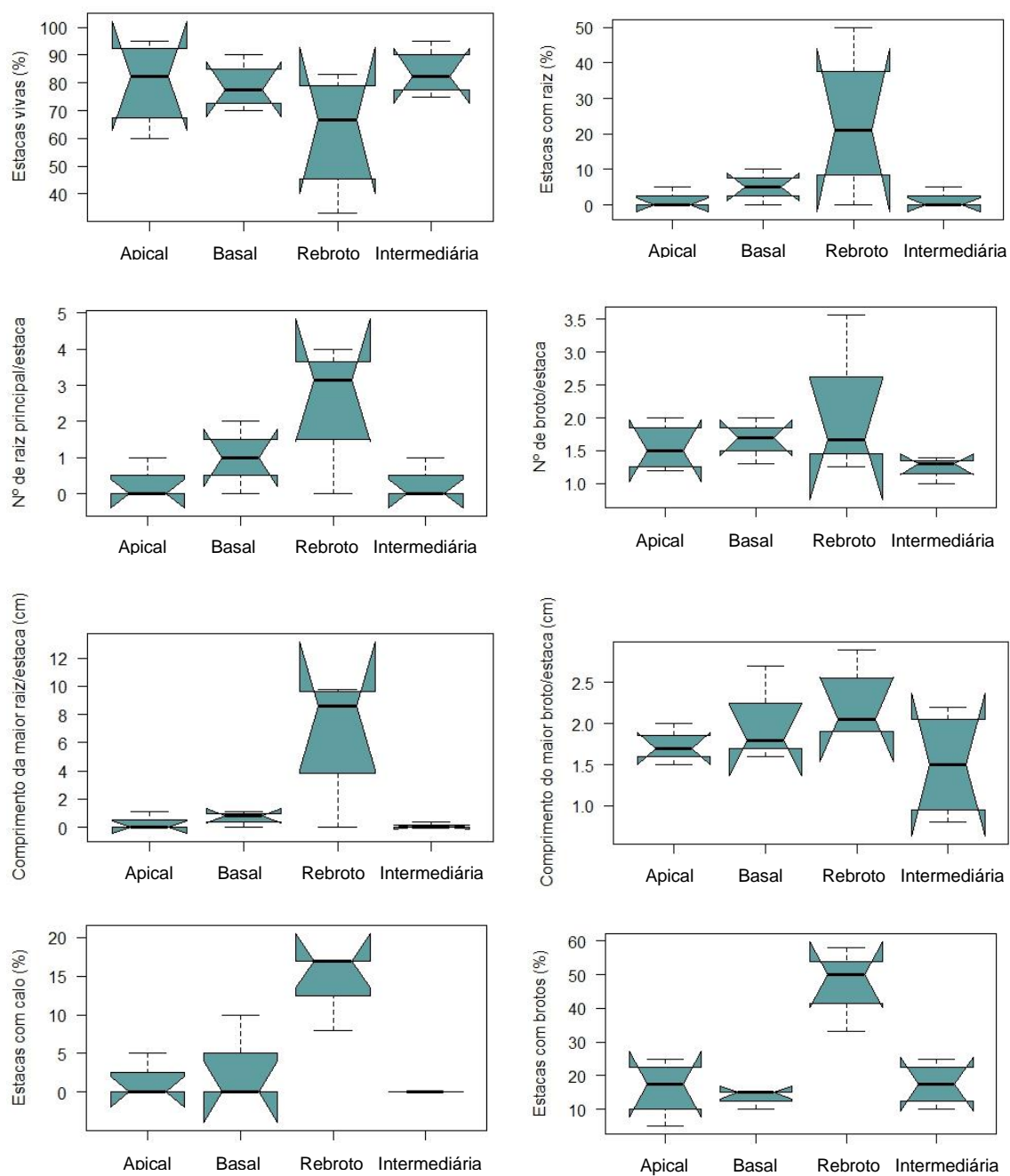


Figura 17: Boxplot das variáveis em função do tipo de estaca apical, intermediária, basal e direto do reboto (experimento 2).

APÊNDICE D – Fotos de estacas enraizadas





Figura 18: Estacas do experimento 1 enraizadas nos diferentes substratos e concentrações de auxina. Nas faixas amarelas A = areia, V = vermiculita e AV = areia+vermiculita, seguido da concentração de AIB (0; 1,5; 3,0 e 6,0 mg kg⁻¹). Em detalhe a base das estacas.

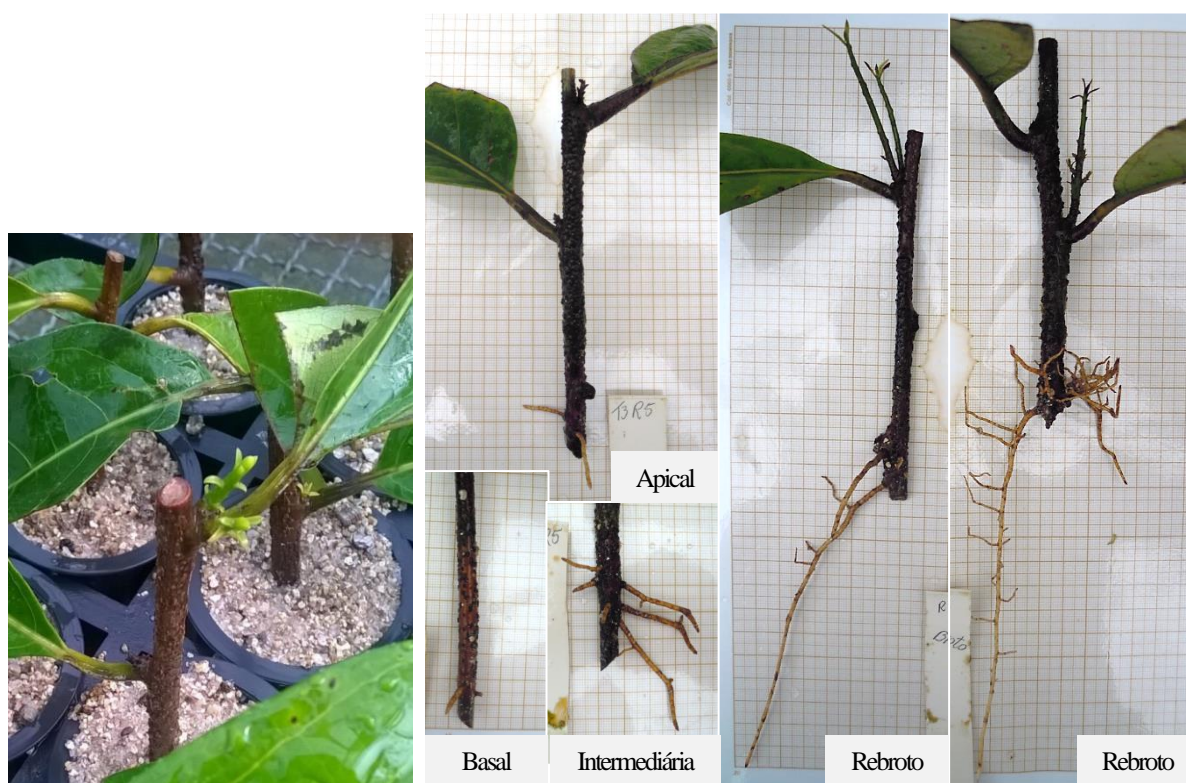


Figura 19: Estacas do experimento 2 (tipo de estaca) com emissão de brotos após um mês do estaqueamento (a esquerda) e de raízes após quatro meses (a direita).