

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FÁBIO VIEIRA SALATTA

Desenvolvimento acelerado de plantas por meio da engenharia fisiológica

Maringá

2023

FÁBIO VIEIRA SALATTA

Desenvolvimento acelerado de plantas por meio da engenharia fisiológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos

Maringá

2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S161d

Salatta, Fábio Vieira

Desenvolvimento acelerado de plantas por meio da engenharia fisiológica / Fábio Vieira Salatta. -- Maringá, PR, 2024.

62 f.: il. color., figs.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2024.

1. Silvicultura. 2. Engenharia fisiológica - Plantas. 3. Hormônios vegetais . 4. Parede celular vegetal - Plantas. 5. Lignina . I. Santos, Wanderley Dantas dos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 571.2

Márcia Regina Paiva - CRB-9/1267

FÁBIO VIEIRA SALATTA

Desenvolvimento acelerado de plantas por meio da engenharia fisiológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 30 de novembro de 2023.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos (PBC/UEM)
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dra. Aline Finger
Instituto Federal do Paraná

Prof. Dr. Lucas Diego Figueiredo
FEITEP

Prof. Dr. Paulo Vinícius Moreira da Costa Menezes
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rodrigo Polimeni Constantim
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Fábio Vieira Salatta nasceu em Colorado (PR) em 24 de fevereiro de 1988. Possui graduação em Tecnologia em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Maringá (2017). Mestre no programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) também pela Universidade Estadual de Maringá em março de 2017. Iniciou seu doutorado no mesmo programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Estadual de Maringá em março de 2019.

AGRADECIMENTO

Primeiramente dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Minha mãe, Luzia Vieira Salatta, que sempre me incentivou.

Meu pai, Valdir Picolli Salatta, pelo exemplo de vida.

Minha esposa, Jessica Aparecida Plaza, que sempre esteve ao meu lado.

Nosso anjinho Arthur, e nossa recente vitória, a pequena Alice.

A presente tese de doutorado não poderia chegar a este ponto sem o apoio de várias pessoas:

Obrigado ao meu orientador Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos, por todo apoio e voto de confiança.

Agradeço aos alunos de graduação, mestrado e doutorado do laboratório BIOPLAN, que contribuíram muito na realização deste trabalho.

Agradeço aos outros professores e técnicos do laboratório BIOPLAN, que também colaboraram ao longo deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

APRESENTAÇÃO

Esta tese intitulada “Desenvolvimento acelerado de plantas através da engenharia fisiológica” avaliou os efeitos dos reguladores de crescimento GA e AIA no metabolismo e morfologia de plantas lenhosas jovens e de uma gramínea. O objetivo foi desenvolver um composto bioestimulante para fazer parte da criação da startup TechSaplings.

RESUMO GERAL

O presente trabalho consiste em uma pesquisa tecnológica que tem como objetivo avaliar o crescimento e desenvolvimento de plantas de interesse ambiental e econômico para os setores silviculturais e pecuário, utilizando reguladores de crescimento vegetal, visando solucionar problemas que impactam esses segmentos. Um dos principais problemas na Silvicultura é a baixa produtividade de mudas lenhosas em viveiros, devido ao crescimento lento desse tipo de planta, e a aplicação de reguladores de crescimento pode ser um forte aliado para ajudar a transpor este obstáculo. Entre os principais reguladores de crescimento, também chamados de hormônios vegetais, estão o ácido giberélico (GA) e o ácido indolacético (AIA), que são essenciais para o crescimento das células vegetais, promovendo a divisão e expansão celular, mas possuem mecanismos de ação diferentes. A primeira parte do estudo teve como objetivo encontrar a melhor concentração de GA para estimular o crescimento e aumento do DAB (diâmetro da altura da base) de plantas jovens de ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) e mogno africano (*Khaya senegalensis*), por um período de acompanhamento de 6 e 4 meses, respectivamente. O tratamento com GA na concentração de 100 μM proporcionou melhor resultado no ipê-roxo e 50 μM no mogno africano, promovendo alongamento do caule, aumento da lignina e redução da sacarificação em ambas as plantas. A segunda parte do estudo avaliou a ação sinérgica do GA associado ao AIA em plantas jovens de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*), onde a giberelina isolada e associada à auxina promoveu alongamento do caule, ganho de biomassa seca de caule e raiz e aumento de lignina, com tratamento contendo 100 μM de GA + 5 μM de AIA. Por fim, a terceira parte consiste em avaliar o uso de GA e AIA no tratamento da braquiária (*Brachiaria decumbens*) cultivada em laboratório e da braquiária pré-existente proveniente de pastagens destinadas à pecuária leiteira, que é uma das forrageiras mais difundidas no Brasil devido pelas suas características favoráveis ao cultivo, e desempenha um papel importante na produção pecuária como uma das principais fontes de alimento do gado. A giberelina isolada e associada à auxina promoveu o crescimento das plantas e aumentou a lignina, mas apenas o tratamento GA3 + AIA proporcionou aumento na biomassa fresca e seca. Mesmo com o aumento do teor de lignina total, a sacarificação não foi alterada. A proporção 1:10 de auxina e giberelina mostrou-se eficiente para crescimento e ganho de biomassa em braquiária.

Palavras chaves: Reguladores de crescimento, ipê-roxo, mogno africano, eucalipto, braquiária

ABSTRACT

The present work consists of technological research that aims to evaluate the growth and development of plants of environmental and economic interest for the forestry and livestock sectors, using plant growth regulators, with the aim of solving problems that impact these segments. One of the main problems in Forestry is the low productivity of woody seedlings in nurseries, due to the slow growth of this type of plant, and the application of growth regulators can be a strong ally to help overcome this obstacle. Among the main growth regulators, also called plant hormones, are gibberellic acid (GA) and indoleacetic acid (IAA), which are essential for the growth of plant cells, promoting cell division and expansion, but have mechanisms of action many different. The first part of the study aimed to find the best concentration of GA to stimulate the growth and increase in DAB (base height diameter) of young plants of ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) and african mahogany (*Khaya senegalensis*), for a follow-up period of 6 and 4 months, respectively. Treatment with GA at a concentration of 100 μM provided better results in ipê-roxo and 50 μM in african mahogany, promoting stem elongation, increased lignin and reduced saccharification in both plants. The second part of the study evaluated the synergistic action of GA associated with IAA in young eucalyptus plants (*Eucalyptus urograndis*), where gibberellin alone and associated with auxin promoted stem elongation, gain in stem and root dry biomass and increase in lignin, with treatment containing 100 μM GA + 5 μM IAA. Finally, the third part consists of evaluating the use of GA and IAA in the treatment of brachiaria (*Brachiaria decumbens*) grown in the laboratory and pre-existing brachiaria from pastures destined for dairy farming, which is one of the most widespread forages in Brazil due to its characteristics favorable to cultivation, and plays an important role in livestock production as one of the main sources of food for livestock. Gibberellin alone and associated with auxin promoted plant growth and increased lignin, but only the GA3 + IAA treatment provided an increase in fresh and dry biomass. Even with the increase in total lignin content, saccharification was not changed. The 1:10 ratio of auxin and gibberellin proved to be efficient for growth and biomass gain in brachiaria.

Keywords: Growth regulators, ipê-roxo, african mahogany, eucalyptus, brachiaria

Artigo de pesquisa completo

Produção acelerada de mudas de ipê e mogno africano por engenharia fisiológica

Fábio Vieira Salatta, Wanderley Dantas dos Santos

Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Laboratório de Bioquímica de Plantas, 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

Autor para correspondência: FVS (fabios15@hotmail.com); WDS (wdsantos@uem.br)
(Tel +55 44 3026 4717)

Este manuscrito foi preparado seguindo as normas para submissão do jornal *Plant Physiology and Biochemistry* (JCR: 5,437)

<https://www.sciencedirect.com/journal/plant-physiology-and-biochemistry>

RESUMO

A silvicultura e a arborização urbana têm se desenvolvido rapidamente devido à crescente necessidade de madeira para construção, papel, celulose, biocombustível para caldeiras, revegetação, armazenamento de carbono e melhoria da qualidade de vida. Na silvicultura, a produção lenta e insuficiente de mudas arbóreas é um gargalo natural para atender à crescente demanda por reflorestamento comercial, arborização urbana e revitalização de áreas degradadas. Assim, nós pesquisamos uma metodologia baseada em semioquímicos para acelerar o crescimento e vigor de mudas lenhosas nativas e exóticas, aliado ao aumento da lignina, componente fundamental da madeira que proporciona maior resistência e rigidez. Plantas jovens de ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) foram cultivadas e tratadas com ácido giberélico nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 μM em doses múltiplas, e mogno africano (*Khaya senegalensis*) com 50, 100, 150 e 200 μM de ácido giberélico. Além dos parâmetros biométricos, avaliamos também o teor de lignina e sacarificação. A giberelina promoveu alongamento do caule, incremento de lignina e redução da sacarificação em ambas as plantas. No ipê-roxo, a melhor concentração foi de 100 μM , e no mongó africano, foi de 50 μM de. A giberelina mostrou-se eficaz para o crescimento e desenvolvimento de plantas lenhosas jovens e aumento de lignina na parede celular, podendo ser considerada uma forte aliada na produção de mudas em viveiro.

Palavras chaves: Reflorestamento, arborização, produção de mudas, crescimento, lignina

ABSTRACT

Forestry and urban afforestation have developed rapidly due to the increasing need for wood for building and furniture, paper, cellulose, boiler biofuel, revegetation, carbon storage and quality of life. In forestry, the slow and insufficient production of tree seedlings is a natural bottleneck to meet the growing demand for commercial reforestation, urban afforestation, and revitalization of degraded areas. Thus, we developed a methodology using plant hormones to accelerate the growth and vigor of native and exotic woody seedlings, combined with an increase in lignin, a fundamental component of wood that provides greater strength and rigidity. Young plants of pink ipe tree (*Handroanthus impetiginosus*) were cultivated and treated with gibberellic acid at concentrations of 100, 250, 500, 750 and 1,000 μM in multiple doses, and african mahogany (*Khaya senegalensis*) with 50, 100, 150 and 200 μM of gibberellic acid. Biometric parameters, lignin and saccharification were evaluated. Gibberellin promoted stem elongation, lignin increment and saccharification reduction in both plants. In pink ipe tree, the best concentration was 100 μM , and in african mahogany, it was 50 μM de. The gibberellin proved to be effective for the growth and development of young woody plants and increase of lignin in the cell wall and can be considered a strong ally in the production of seedlings in the nursery.

Keywords: Reforestation, afforestation, seedling production, growth, lignin

Introdução

A demanda por madeira para a produção de bioenergia e o comércio de outros produtos florestais está aumentando no cenário mundial como uma alternativa a produtos de fontes não renováveis. Esta demanda crescente também se deve à crescente preocupação com a recuperação de áreas florestais degradadas, exigindo processos de reflorestamento rápidos e eficientes, aliados à economia de custos (Souza, 2006; Araújo et al., 2017). No cenário nacional, também crescem as regulamentações municipais para a arborização urbana visando elucidar problemas causados pelo plantio desordenado e inadequado de espécies arbóreas. A padronização de mudas destinadas para plantio em vias públicas é um dos principais regulamentos (Sabadini, 2007). Assim, os hormônios vegetais, ou também conhecidos como reguladores de crescimento ou bioestimulantes, na silvicultura e na arborização urbana, podem contribuir para a produção de mudas arbóreas, principalmente quando se considera o aumento da produtividade à medida que as plantas se desenvolvem mais rapidamente e se tornam mais eficientes (Oliveira et al., 2019; Rodrigues et al., 2015).

Reguladores de crescimento vegetais são moléculas químicas sintéticas ou extraídas de compostos naturais que promovem ação semelhantes aos hormônios produzidos pelas plantas, atuando como moléculas sinalizadoras capazes de mediar as respostas dos vegetais ao ambiente durante as fases de crescimento e desenvolvimento, sem apresentar efeito nutriente (Macedo et al., 2015; Rodrigues et al., 2015). Esses reguladores de crescimento têm a função de promover, inibir ou modificar processos morfológicos e fisiológicos nas plantas. O crescimento e desenvolvimento das plantas é mediado principalmente por um grupo de cinco hormônio vegetais: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico, porém, existem outros grupos de moléculas como os brassinoesteroides, jasmonatos e estrigolactonas que também atuam como moléculas sinalizadoras, mas com menor intensidade e em momentos pontuais (Fosket et al., 1994; Vieira, et al., 2010; Taiz e Zaiger, 2017; Sena et al., 2019).

A utilização de espécies arbóreas nativas e exóticas para arborização urbana, plantios comerciais, reflorestamento, revegetação de áreas degradadas e matas ciliares, torna a produção de mudas de qualidade uma prática fundamental para o êxito dessas atividades. Dessa forma, a crescente demanda por mudas florestais observada nos últimos anos pressiona pelo desenvolvimento de protocolos que otimizem a produção de mudas, a baixo custo e com qualidade morfofisiológica, capazes de atender às necessidades dos plantios.

Arboricultura de espécies nativas e exóticas

A progressiva demanda por mudas de espécies lenhosas observada nos últimos anos mostra a necessidade do desenvolvimento de protocolos que otimizem a produção de mudas, a baixo custo e com qualidade morfofisiológica, capazes de atender às necessidades dos plantios. Neste trabalho, foram escolhidas duas espécies arbóreas exóticas (mogno africano e eucalipto), de grande valor econômico na exploração de suas madeiras por meio de reflorestamento comercial, e uma espécie nativa (ipê roxo), embora também seja atraente comercializar sua madeira, possui uma grande distribuição na arborização urbana (Boschetti et al., 2015; Martins et al., 2012).

Mogno Africano

O mogno africano (*Khaya spp.*) pertence à família Meliaceae e tem origem em diferentes países africanos, e as principais espécies são as *Khaya ivorensis*, *Khaya senegalensis* e *Khaya anthoteca*. Essas espécies foram importadas para o Brasil há mais de 30 anos para substituir a espécie nativa brasileira *Swietenia macrophylla* devido a sua escassez e restrição por lei, inviabilizando economicamente sua produção no país (Gasparotto et al., 2001; Couto et al., 2004; Ibrahim et al., 2006).

No Brasil, o mogno africano é uma das principais madeiras nobres cultivadas devido suas qualidades como cor, desenho da grã, propriedades físicas e mecânicas e apresentando alto valor econômico. Sua comercialização é muito empregada na indústria moveleira de luxo, naval e construção civil, favorecida pelo fuste reto, cilíndrico e sem galhos até uma altura de 30 metros. Além de possuir uma grande capacidade adaptativa, podendo ser utilizada para revitalização de áreas degradadas (Pinheiro et al., 2006; Ribeiro et al., 2017).

O gênero *Khaya spp.* pode atingir grandes dimensões, com altura variando de 30 a 35 metros, e pode atingir uma altura superior a 60 metros e 2 metros de diâmetro (Pinheiro et al., 2011). É classificada como madeira de lei, apresentando coloração de avermelhada à marrom pálido, boa trabalhabilidade e alta durabilidade (Walker et al., 1993; Cabi, 2013).

Ipê roxo

Mais de 40 espécies de ipês podem ser encontradas no Brasil, e uma das mais conhecidas é o *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC) Mattos, recentemente incluído no gênero, é uma espécie arbórea pertencente à família Bignoniaceae, conhecida como ipê roxo ou ipê rosa dependendo do autor. É uma árvore decídua de crescimento moderado, com altura média de 8 a 12 m, podendo atingir até 30 m, e seu tronco pode medir até 90 cm de diâmetro, apresentando madeira de excelente qualidade, pesada, dura, de cerne acastanhado (Carvalho et al., 1992; Grose

et al., 2007). O ipê é originário da América do Sul e pode ser comumente encontrado em áreas de vegetação nativa do norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil. Esta espécie é muito apreciada para arborização urbana, fabricação de móveis e assoalhos finos, construção civil e possui propriedades farmacológicas com ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e antineoplásica (Carvalho et al., 1992; Gemaque et al., 2002).

O ipê é uma árvore amplamente utilizada na arborização urbana no sudeste e no centro-oeste do Brasil e na revitalização de florestas nativas devido ao seu raro efeito ornamental durante a abundante floração, durante julho até agosto, destacando-se em projetos paisagísticos e atraindo polinizadores como beija-flores e abelhas, além de possuir raízes profundas e vigorosas (Gemaque et al., 2002).

Arborização urbana

A concentração de pessoas nos centros urbanos tem acelerado de tal modo que em 2050, cerca de 64% a 70% da população deverá estar em áreas urbanas, resultando em inúmeros problemas ecológicos, econômicos e sociais. Com objetivo de melhorar a qualidade de vida das pessoas, a arborização urbana no Brasil, que tradicionalmente ocorre de forma desordenada e sem planejamento, está recebendo atenção, de modo que cada vez mais cidades estão adotando regulamentos para a melhoria do manejo, expansão e conservação das árvores em áreas públicas, levando benefícios para a sociedade e reduzindo os gastos públicos (ONU, 2012; Leitão et al., 2013; Sampaio et al., 2019).

O Plano de Gestão da Arborização Urbana (PGAU) do município de Maringá-PR, 2019, consiste no conjunto de medidas, métodos e diretrizes a serem adotadas para planejar, gerir e monitorar a arborização urbana do município, semelhantes aos modelos de planos de gestão de outras cidades, que seguem um padrão. Um dos regulamentos do PGAU é a padronização da produção de mudas arbóreas em viveiros, destinadas ao plantio em vias públicas, evitando gastos públicos adicionais futuros com poda, corte e reposições, e tornando a arborização urbana menos onerosa (Figura 1).

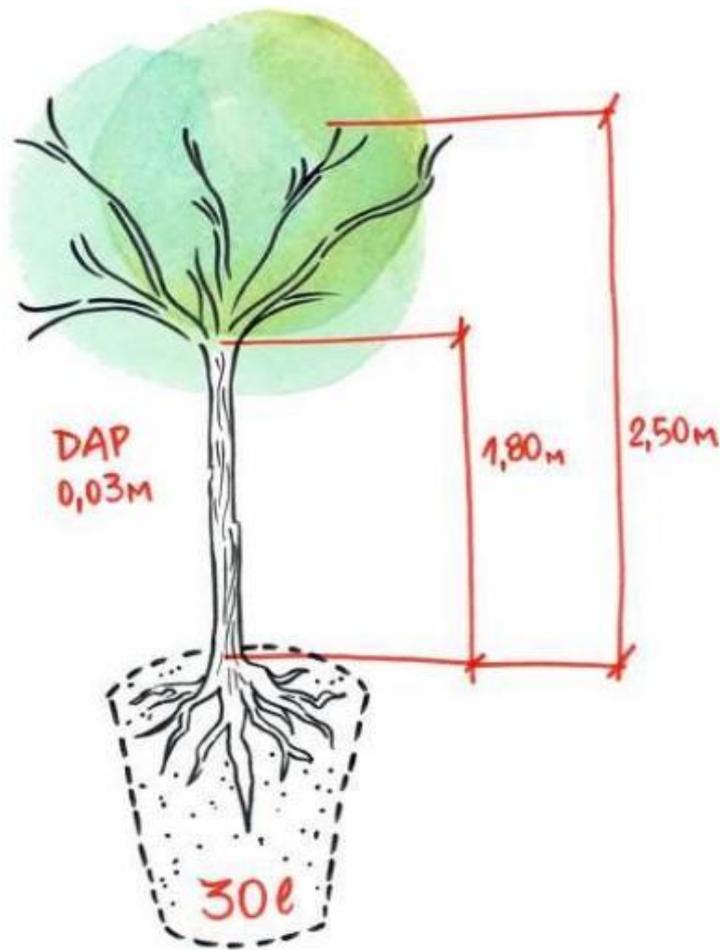


Figura 1 - Padrão de muda para plantio na arborização urbana em Maringá (PGAU, 2019).

As mudas destinadas a áreas urbanas devem ter uma altura total superior a 2,0 m e altura mínima dos primeiros galhos (altura de bifurcação) de 1,80 m, além de um diâmetro à altura do peito (DAP) mínimo de 3,0 cm e um torrão de no mínimo 30 l de substrato (Figura 1). As mudas prontas para o plantio devem estar saudáveis, com tronco reto, apresentar brotações visivelmente saudáveis e raízes bem formadas. Mas o problema está no tempo elevado para se produzir uma muda com este porte, que pode chegar a 2 anos, inviabilizando ou onerando a produção de viveiros públicos e privados (PGAU, 2019).

Hormônios vegetais

Os hormônios vegetais ou fitormônios são compostos orgânicos que atuam de forma integrada na regulação das reações de desenvolvimento e crescimento das plantas, operando coordenadamente para manutenção da homeostase vegetal. A regulação é feita de uma maneira complexa por uma extensa rede de sinalização interna, em que, os sinais internos são transmitidos por hormônios e enzimas, que atuam em resposta a flutuações ambientais. Essa rede de sinalização

é impulsionada por uma cascata de transdução de sinais que permite comunicação entre a membrana celular e o núcleo, nesse contexto, todo o ciclo de vida vegetal é regulado. A transdução de sinais ocorre por meio de quinases que catalisam a fosforilação, alterando a atividade biológica de enzimas (proteínas), resultando em sua ativação ou inativação (Taiz et al., 2017). Fatores externos também afetam o crescimento e desenvolvimento, como luz (energia solar), dióxido de carbono, água, minerais, temperatura, comprimento do dia e gravidade (Amaral, 2012; Raven et al., 2001).

Giberelina

As giberelinas (GAs) são um dos principais grupos de hormônios vegetais, amplamente distribuídas no reino vegetal, e estão presentes em toda a planta, podendo ser encontradas em caules, folhas, sementes, embriões e pólenes. As GAs constituem uma grande família de ácidos diterpênicos, e dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA₃) é um importante promotor e regulador de crescimento. Ele estimula o alongamento do caule e a diferenciação do câmbio vascular para a maior formação tecidual de xilema e floema em plantas lenhosas (Tucker et al., 2000; Davies, 2004; Rodrigues, 2015; Santarosa et al., 2016). As giberelinas são diterpenoides tetracíclicos formados por quatro unidades isoprenoides, e a unidade biológica ativa de isopreno é o isopentenil difosfato (IPP). Para a biossíntese de terpenoides, o IPP utilizado é formado através de duas vias distintas: uma via dependente do ácido mevalônico, que ocorre no citosol e está envolvida primariamente na biossíntese de esteróis; a outra via que é independente do ácido mevalônico, sendo localizada nos plastídios e leva à síntese de carotenoides e compostos relacionados (Aloni et al., 1979; De Rezende et al., 2016;). As GAs são produzidas principalmente em tecidos jovens do sistema caulinar e sementes em desenvolvimento e, após a síntese, são transportadas sem polarização pelo xilema e floema, do ápice até a base (Cramer et al., 1995).

Lignina

A lignina é um heteropolímero aromático, com maior concentração em tecidos relacionados com suporte mecânico e condução de solutos como os vasos do xilema, sendo formada na via dos fenilpropanoides (Fengel e Wegener, 1989). O processo de lignificação das paredes celulares no desenvolvimento do xilema, e conseqüentemente na formação do lenho, está relacionada com a regulação das enzimas da via através da sinalização por hormônios vegetais, estimulados por fatores internos e externos (Savidge e Wareing, 1981; Little e Savidge, 1987).

A biossíntese de lignina é dividida em três processos: a biossíntese de monolignóis, transporte e polimerização. Os monolignóis de lignina são produzidos no citoplasma, envolvendo

etapas de desaminação, hidroxilação, metilação e redução dentro da via dos fenilpropanoides, onde são transportados para a parede celular por processos ainda não totalmente compreendidos. O polímero de lignina é formado principalmente por três álcoois hidroxicinamil (monolignóis), que diferem no grau de metoxilação no anel aromático: álcool sinapílico, álcool coniferílico e álcool *p*-coumarílico, que são polimerizados por peroxidases (PODs) e lacases (LACs). Após a ligação dos monolignóis à uma lignina, são denominados monômeros siringil (S), guaiacil (G) e *p*-hidroxifenil (H) respectivamente (Carpita e McCann, 2000; Vanholme et al., 2010; Liu et al., 2018). Em madeiras duras, as ligninas são mais ricas em unidades siringil (S), sendo denominadas de ligninas do tipo GS. No desenvolvimento das células vegetais, a lignina é incorporada como o último componente na parede, interpenetrando entre as fibrilas e, assim, as paredes celulares tornam-se mais fortes e rígidas. (Fengel e Wegener, 1989; Klock et al., 2005).

Nas plantas vasculares, a lignina é responsável pela resistência mecânica aumentada a rigidez da parede celular, permitindo o crescimento longitudinal, o transporte de nutrientes, água e metabólitos, a impermeabilização de tecidos condutores, e a proteção contra a ação de microrganismos (Rowell et al., 2005). Isso é devido sua estrutura tridimensional que fornece resistência às forças de compressão, formando uma estrutura rígida e impermeável na parede da célula, que funciona ainda como um agente de ligação permanente entre as células (Philipp, 1988).

Os hormônios vegetais têm sido cada vez mais utilizados na agricultura com o intuito de aumentar a produtividade, pois promovem o desenvolvimento acelerado das plantas, tornando a produção mais eficiente, sendo agora proposto o uso desses hormônios na silvicultura a fim de possibilitar o aumento da produção de plantas arbóreas com dimensões adequadas para o plantio (Oliveira et al., 2019; Rodrigues et al., 2015). Assim, neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia a base de hormônios vegetais capaz de acelerar o crescimento e porte de mudas arbóreas e melhorar a vigorosidade para transpor o processo de rustificação e sobrevivência em campo, e estudou-se a importância da lignina nesses processos.

Materiais e métodos

Cultivo

As sementes de ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) e mogno africano (*Khaya senegalensis*) foram obtidas comercialmente e/ou disponibilizado pelo Viveiro Floresta Nativa, Maringá-Pr. A germinação ocorreu em casa de vegetação dentro do Centro de Treinamento em Irrigação da UEM, utilizando bandejas sementeiras contendo substrato de casca de pinus. Após 60 dias, as mudas de mogno foram transferidas e cultivadas em tubetes de 290 ml contendo substrato

de casca de pinus e adubo NPK 10:10:10, e as mudas de ipê cultivadas em sacos plástico de 3 l contendo latossolo roxo e adubo NPK 10:10:10.

O tratamento inicial em mudas de ipê roxo foi com GA₃ nas concentrações 100, 250, 500, 750 e 1000 µM em doses múltiplas no 3º, 6º e 9º mês de cultivo. Com o mogno africano, foram utilizadas concentrações de 50, 100, 150 e 200 µM de GA₃ em doses múltiplas no 3º mês de cultivo.

Determinação dos parâmetros biométricos

As plantas tiveram seu crescimento aferido, determinando-se a altura das plantas e diâmetro dos caules com auxílio de fita métrica e paquímetro. A biomassa do caule foi seca a 50°C e pesada.

Determinação da lignina

O protocolo utilizado para quantificar a lignina foi realizado após a preparação dos tecidos para excluir proteínas e outros componentes da parede celular. Esta remoção é essencial para evitar a interferência destes compostos.

Preparação de parede celular sem proteína

As amostras secas (0,3 g) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM (7 ml, pH 7,0) usando gral e pistilo e depois transferidas para um tubo de centrífuga. A suspensão foi centrifugada (1,400 xg, 4 min), lavada por agitação sucessiva e centrifugada como se segue: oito vezes com tampão fosfato de potássio (pH 7,0; 7 ml), quatro vezes com Triton X-100 a 1% (v/v) em tampão pH 7,0 (7 ml), seis vezes com NaCl 1 M em tampão pH 7,0 (7 ml), três vezes com água destilada (7 ml) e duas vezes com acetona PA (5 ml). O pellet foi seco em estufa (60 °C, 24 h) e arrefecido em dessecador a vácuo. A matéria seca obtida foi definida como a fração da parede celular sem proteína (Ferrarese et al., 2002).

Lignina total

As amostras de parede celular livre de proteína (20 mg) foram colocadas em tubos de centrífuga de tampa roscada contendo 0,5 ml de brometo de acetila a 25% (v/v em ácido acético PA) e incubadas a 70 °C por 30 min. Após a digestão completa, as amostras foram rapidamente arrefecidas em banho de gelo e então misturada com 0,9 ml de NaOH 2 M, 0,1 ml de hidroxilamina-HCl 5 M e 6 ml de ácido acético PA suficiente para solubilização completa do extrato de lignina. Após centrifugação (1.400 × g, 4 min), a absorbância do sobrenadante foi

medida a 280 nm. Uma curva padrão foi gerada com lignina alcalina (Aldrich 37, 096-7). Os resultados expressos em mg lignina g⁻¹ de parede celular (Moreira-Vilar et al., 2014).

Determinação sacarificação enzimática

O protocolo utilizado para realizar a sacarificação enzimática foi realizado após a preparação dos tecidos para a retirada de açúcares solúveis da biomassa. A sacarificação é a determinação da glicose livre após o uso de enzimas específicas para quebrar as ligações β-1,4 da celulose.

Preparação da biomassa isenta de açúcares solúveis

Amostras secas (300 mg) em telas de nylon semipermeáveis foram colocadas no sistema de refluxo Soxhlet com etanol puro (Freitas et al., 2018), por aproximadamente 10h. Em seguida, as biomassas foram transferidas para estufa a 60 °C.

Quantificação de açúcares redutores

Em Eppendorf de 2 ml, foi pesado 10 mg da biomassa isenta de açúcares solúveis, adicionou-se 10 µl do coquetel enzimático celulolítico (Novozymes – NS 22086) e completado para 1 ml com tampão acetato de sódio pH 5,0. Após incubação a 50 °C por 4h e 24h de reação, 100 µl do sobrenadante foram coletados em tubos de ensaio, adicionados 100 µl do reagente DNS 1%, e incubado a 100 °C por 5 min. Completado com 800 µl do tampão acetato de sódio, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Para o branco, foram utilizados 100 µl do DNS 1% e 900 µl do tampão fosfato de sódio. Os resultados foram expressos com a quantificação de glicose livre em mg g⁻¹ de biomassa (Miller, 1959).

Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM). O teste Dunnett e Test t de Student foram realizados com o programa GraphPad *Prism 5.0* (San Diego, Califórnia) para verificar as significâncias das diferenças entre os parâmetros avaliados, valores de $0.05 \geq P \geq 0.01$ são representados por *, valores de $0.01 \geq P \geq 0.001$ serão representados por **, e valores de $0.001 \geq P$ serão representados por *** sendo todos considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Ipê roxo

Para determinar as melhores concentrações de ácido giberélico capazes estimular o crescimento caulinar em mudas de ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*), realizamos 3 aplicações semanais de GA₃ nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µM, em pleno sol, por um período de 30 dias. A aplicação de giberelina promoveu alterações significativas na altura da planta, no diâmetro na altura da base (DAB), no conteúdo lignina e na sacarificação dos caules (Figura 2, 3 e 4).

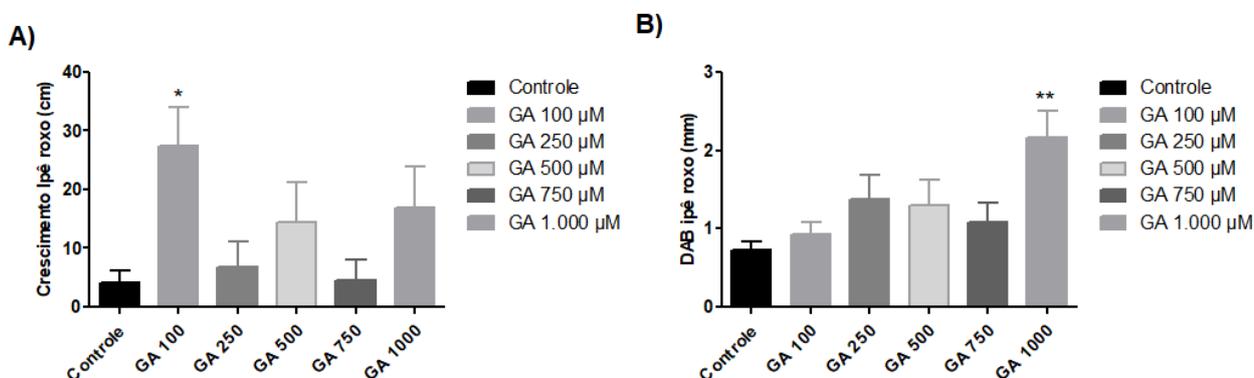


Figura 2. Crescimento do ipê no período de 30 dias tratado com diferentes concentrações de GA₃. A) altura do caule (fuste). B) Diâmetro da altura da base (DAB). Barras indicam as médias \pm EPM, $n = 10$. Teste de Dunnet: * $0.05 \geq P \geq 0.01$, ** $0.01 \geq P \geq 0.001$, *** $0.001 \geq P$.

A melhor concentração de GA₃ para o crescimento caulinar foi de 100 µM (Figura 2A), que promoveu um aumento de 568,78%, em relação ao controle. A melhor concentração para aumentar o diâmetro da altura da base (DAB) foi de 1000 µM, com aumento de 197,26%, em relação ao controle (Figura 2B).

Como o GA₃ 100 µM foi a melhor concentração para o crescimento do caule no primeiro mês, um acampamento mensal do crescimento caulinar e do DAB foi realizado por 6 meses para determinar o melhor intervalo para novas aplicações do hormônio vegetal. No terceiro mês, foram realizadas mais duas aplicações semanais de GA₃ 100 µM. Ao final do sexto mês, houve um aumento no crescimento do caule de 194,74% em relação ao controle (Figura 3A) e um aumento de 38,91% no DAB (Figura 3B).

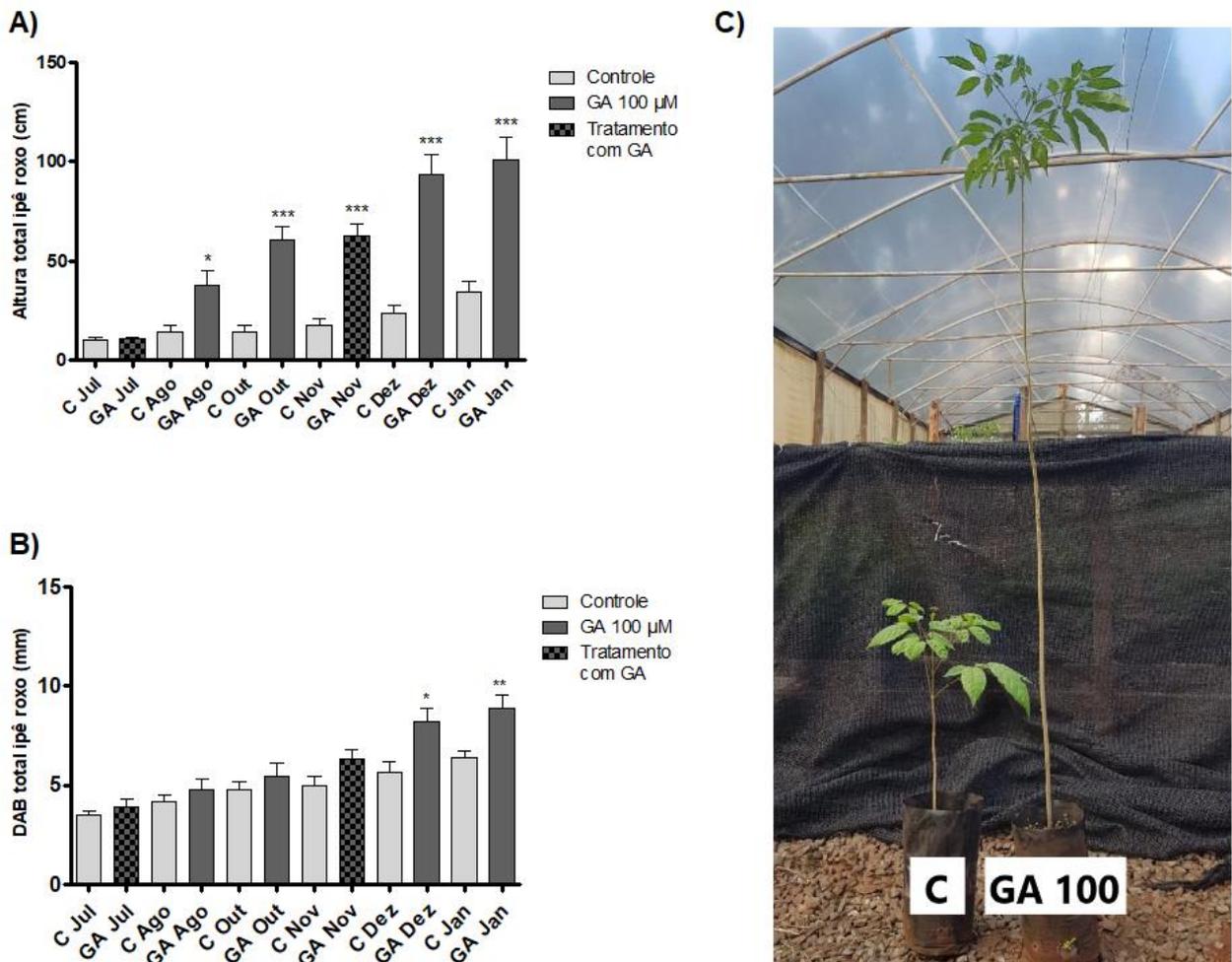


Figura 3. Crescimento do ipê no período de 6 meses tratado com diferentes concentrações de GA₃. A) Altura do ipê roxo controle (barras cinza-claros) e GA₃ 100 µM (barras cinza-escuro e quadriculadas) ao longo de 6 meses. B) Diâmetro na altura da base (DAB) de ipê roxo controle e GA₃ 100 µM. D) DAB de ipê roxo do controle e GA₃ 100 µM em linhas empilhadas (para facilitar a comparação). C) Ipê roxo tratado com 100 µM de GA₃ e controle no período de 6 meses. Barras quadriculadas e marcadores verdes indicam o momento, onde os tratamentos foram aplicados. Barras de erro indicam as médias ± EPM, *n* = 5. Teste t de Student: *0.05 ≥ *P* ≥ 0.01, **0.01 ≥ *P* ≥ 0.001, ***0.001 ≥ *P*.

O teor de lignina no caule do ipê cultivado ao longo de 6 meses aumentou 37,63%, com valores de 229,62 mg/g de lignina total nas plantas tratadas e 166,90 mg/g de lignina nas plantas-controle (Figura 4A). Na análise da sacarificação das amostras do caule, obteve-se que em 24 h de digestão, a sacarificação foi reduzida em 17,70%. Em 4 h não houve diferença com o controle (Figura 4B,C).

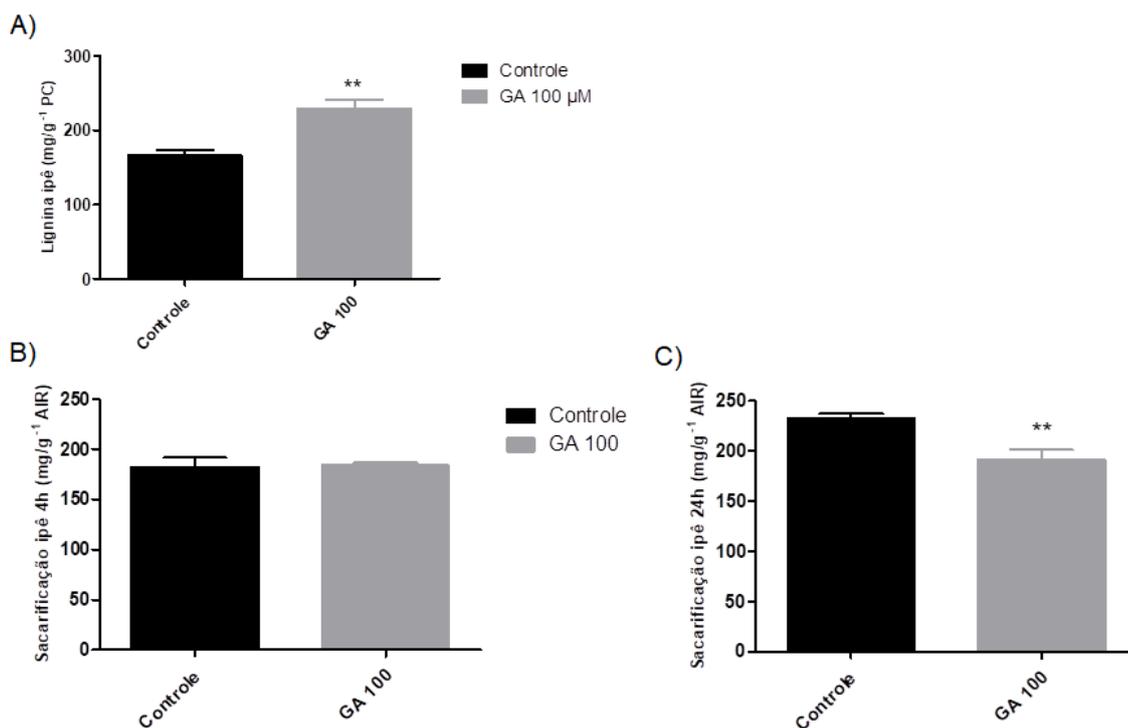


Figura 4. Conteúdo de lignina e sacarificação do caule de ipê roxo cultivado por 6 meses. A) Teor total de lignina da biomassa do caule de ipê roxo com o controle e GA₃ 100 µM. B e C) Sacarificação da celulose em glicose 4 h (esquerda) e 24 h (direita) da biomassa lignocelulósica de ipê roxo controle e GA₃ 100 µM. Barras indicam as médias ± EPM, n = 5. Teste t de Student: **P ≥ 0.001.

Mogno africano

Para o mogno africano (*Khaya senegalensis*), 3 aplicações mensais de GA₃ foram realizadas nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 µM a pleno sol, com o objetivo de estimular o crescimento do caule em tubetes, durante um período de 7 meses. Todos os tratamentos com giberelina promoveram um crescimento significativo do caule, porém, o DAB e a biomassa seca, não apresentaram alterações significativas (Figura 5).

Todas as concentrações de GA₃ (50, 100, 150 e 200 µM) elevaram a altura do caule em 72,02%, 61,08%, 61,99% e 60,88%, respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 5A). O DAB não apresentou variação significativa com relação ao controle, embora as médias tenham crescido entre 8,96% e 20,26%, nas plantas tratadas com GA₃ (Figura 5B). A biomassa seca do caule também não variou significativamente, embora as médias tenham sido sempre maiores que a dos controles entre 6,5 e 20,38% nos tratamentos com GA₃ 50, 100, 150 e 200 µM, respectivamente quando comparadas à altura média do controle (Figura 5C).

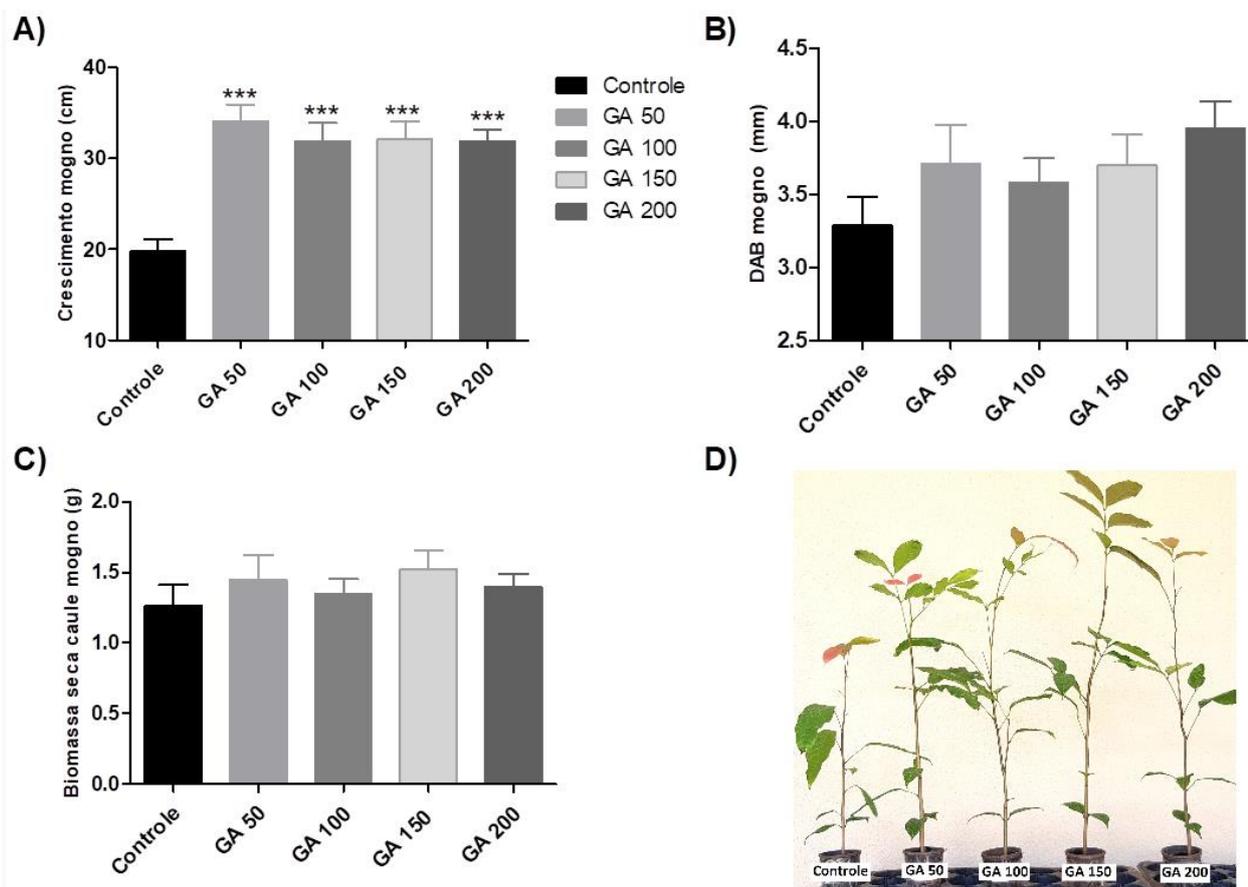


Figura 5. Crescimento do mogno africano tratado com diferentes concentrações de GA₃ ao longo de 7 meses. A) Altura média do mogno africano do controle e GA₃ nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μ M a pleno sol, durante um período de 7 meses. B) DAB médio do mogno africano do controle e GA₃ nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μ M a pleno sol, durante um período de 7 meses. C) Gráfico da biomassa seca do caule (mogno africano) do controle e GA₃ nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μ M (g). D) Foto do mogno africano do controle com os tratamentos de GA₃. Barras indicam as médias \pm EPM, n = 10. Teste de Dunnet: ***P \geq 0.001.

O teor de lignina no caule do mogno aumentou significativamente em todas as concentrações do tratamento com giberelina, com o menor aumento de 29,84% no tratamento com 50 μ M de GA₃, e o maior aumento de 42,10% com 150 μ M de GA₃, com valores de 168,32 e 184,1 mg/g de lignina total nestes tratamentos, respectivamente, contra apenas 129,64 mg/g de lignina no controle (Figura 6A). No mogno, também houve relação inversa com os resultados da sacarificação em relação à lignina. Os tratamentos reduziram a sacarificação entre 21,95% e 27,82%, quando a digestão foi conduzida por 24 h, não havendo diferença na digestão realizada por 4 h (Figura 6B e 6C).

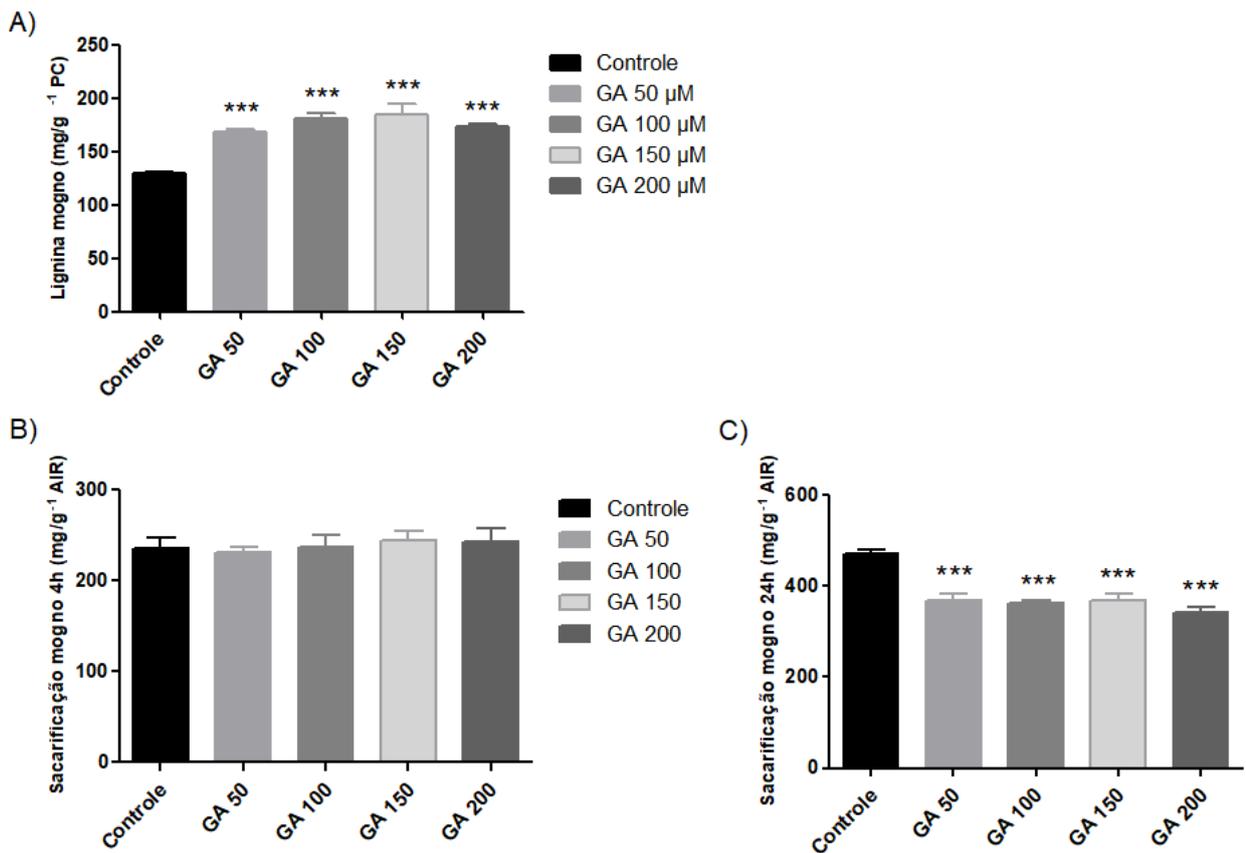


Figura 6. A) Teor total de lignina da biomassa do caule de mogno africano com o controle e tratamento com 100 μM GA_3 (mg/g de CW). B e C) Sacarificação da celulose em glicose 4h e 24h da biomassa de mogno africano com o controle e tratamento com 100 μM GA_3 (mg/g de AIR). Barras de erro indicam as médias \pm EPM, $n = 10$. Teste de Dunnet: $*0.05 \geq P \geq 0.01$, $**0.01 \geq P \geq 0.001$, $***0.001 \geq P$.

Discussão

A giberelina aplicada exogenamente em plantas jovens de *Handroanthus impetiginosus* e *Khaya senegalensis*, acelerou o crescimento e aumentou o DAB, reduzindo o tempo necessário para as atingir o tamanho ideal de plantio visando atender as exigências da legislação para arborização urbana (e.g. PGAU, 2019). Além disso, o tratamento foi capaz de elevar o teor total de lignina presente nos caules foi significativamente aumentado o que implica em uma planta mais resistente e menos suscetível ao ataque de patógenos com ficou evidenciado pela redução na sacarificação da biomassa das duas espécies arbóreas.

As giberelinas exercem funções frequentemente associadas à promoção do crescimento do caule, e a aplicação de GAs em plantas integras pode proporcionar um aumento significativo na altura dessa planta (Lacerda et al., 2007). Essa propriedade foi confirmada nas plantas avaliadas nesse experimento, que identificou que a melhor concentração para o crescimento caulinar no ipê

roxo foi de 100 μM , e para o mogno africano de 50 μM , demonstrando ser possível acelerar o crescimento e o porte de mudas arbóreas para arborização urbana e reflorestamento comercial. Mas, todas as concentrações de GAs apresentaram alterações nas folhas dos ipês, tornando-as mais alongadas e estreitas. Isso pode ser decorrente do fato de que o alongamento acelerado do caule se torna um forte dreno por nutrientes da planta (Lacerda et al., 2007), e/ou pelas aplicações foliares de GA em plantas muito jovens. A mistura de dois ou mais reguladores vegetais com uma adubação adequada para suprir a demanda de nutrientes, pode potencializar o desenvolvendo de outros órgãos da planta, podendo minimizar a alteração foliar observada (Castro e Vieira, 2001).

A lignina é um componente fundamental na estrutura da parede celular das espécies arbóreas, responsável principalmente pela resistência mecânica que permite o crescimento longitudinal, pelo transporte de nutrientes e pela proteção contra estresses abióticos, assim, caules de ipê e mogno com maior teor de lignina resultante da aplicação de giberelina tem uma vantagem sobre uma planta não tratada (Rowell et al, 2005). Segundo a literatura, a lignificação da parede celular está associada à dificuldade de degradação do material e à diminuição da acessibilidade à celulose, propriedade denominada recalcitrância, o que justifica a redução da sacarificação (Freudenberg et al., 1965; Zhang et al., 2015). No estudo em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), foram observadas alterações na formação e depósito de lignina semelhantes, e espessamento das paredes celulares, tratadas com GA₃ nas concentrações de 10 e 100 μM cultivadas em diferentes intensidades de luz. A pleno sol, a aplicação de GA₃, nas concentrações de 10 e 100 μM , induziu a produção de lignina nos caules em 12,4% e 28,1%, respectivamente. Da mesma forma, em ambiente sombreado, a aplicação de GA₃ nas concentrações de 10 e 100 μM promoveu aumentos no conteúdo de lignina de 23,1% e 28,2% (Falcioni et al., 2018). Nosso estudo demonstrou que nas concentrações adequadas, GA₃ foi capaz de induzir a formação de lignina, o que elevou a resistência física das mudas. Também demonstramos que GA₃ reduziu a sacarificação da lignocelulose em ambas as espécies, sugerindo que o aumento na concentração de lignina também oferece proteção química às mudas que assim, estariam menos susceptíveis ao ataque de insetos e patógenos. As plantas de ipê roxo tratadas com GA₃ por 6 meses, atingiram o porte requerido para plantio urbano de acordo com as normas do Plano de Gestão da Arborização Urbana da Secretaria do Meio Ambiente e Bem Estar Animal do Município de Maringá. Sem o tratamento, estas mudas levam cerca de 18 a 24 meses para atingir o mesmo porte, o que implica que o tratamento com GA₃ acelerou o crescimento entre 3 e 4 vezes, quando comparado ao crescimento convencional. Da mesma forma, as mudas de mogno africano também atingiram a altura ideal de plantio (30 cm), em menos de 3 meses, em comparação ao controle, que ultrapassaria 6 meses de cultivo.

Conclusão

Na melhor concentração, o tratamento com giberelina mostrou-se eficaz para promover o alongamento do caule e aumento da lignina na parede celular de *Handroanthus impetiginosus* e *Khaya senegalensis*. O crescimento acelerado de mudas, como o ipê-roxo, pode reduzir o tempo em viveiro necessário para atender às características de tamanho obrigatório para transplante em vias públicas. De modo similar, o ácido giberélico ajudou a acelerar o crescimento de mudas de mogno africano. Em ambos os casos o tratamento estimulou o crescimento com elevação no conteúdo de lignina no caule que contribui para a rustificação e sobrevivência no campo, ajudando a superar estresses bióticos e abióticos.

Referências

- Aloni, R. Role of auxin and gibberellin in differentiation of primary phloem fibers. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 63, p. 609-614, 1979.
- Araujo, V. A.; Garcia, J. N.; Cortez-Barbosa, J.; Gava, M.; Savi, A. F.; Morales, E. A. M.; Christoforo, A. L. Importância da madeira de florestas plantadas para a indústria de manufaturados. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 37, n. 90, p. 189-200, 2017.
- Boschetti, W. T. N. Características anatômicas para produção de celulose do lenho de reação de árvores inclinadas de eucalipto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, p. 459-467, 2015.
- Carvalho, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1992.
- Castro, P. R. C.; Vieira, E. L. Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical. Guaíba, BR: Editora Agropecuária, 2001.
- Centre For Agriculture And Biosciences International – CABI. *Forestry Compendium*. Wallingford: CAB International. Disponível em: <www.cabi.org/fc>. Acessado em: 22 ago. 2022.
- Couto, L.; Watzlawick, L. F.; Câmara, D. Vias de valorização energética da biomassa. *Biomassa & Energia*, v. 1, n. 1, p. 71-92, 2004.
- Cramer, M. D. Reduction, assimilation and transport of N in normal and gibberellins deficient tomato plants. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 95, p. 347-354, 1995.

- Davies, P. J. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Kluwer Academic, Netherlands, 2004.
- De Rezende, F. M. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. *Laboratório de Ensino de Botânica*, v. 93, 2016.
- Falcioni, R.; Moriwaki, T.; De Oliveira, D. M.; Andreotti, G. C.; De Souza, L. A.; Dos Santos, W. D.; ANTUNES, W. C. Increased gibberellins and light levels promote cell wall thickness and enhance lignin deposition in xylem fibers. *Frontiers in plant science*, v. 9, 2018.
- Fengel, D.; Wegener, G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed*, v. 23, p. 601, 1989.
- Ferrarese, M. L. L.; Zottis, A.; Ferrarese-Filho, O. Quantificação de lignina livre de proteína em raízes de soja (*Glycine max*). *Biol.* v. 57, p. 541-543, 2002.
- Fosket, D. E. *Plant growth and development: A molecular approach*. Elsevier, 2012.
- Freudenberg, K. Lignin: Its Constitution and Formation from p-Hydroxycinnamyl Alcohol: Lignin is duplicated by dehydrogenation of these alcohols; intermediates explain formation and structure. *Science*, v. 148, n. 3670, p. 595-600, 1965.
- Gasparotto, L.; Hanada, R. E.; Albuquerque, F. C.; Duarte, M. L. R. Mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em mogno africano. *Fitopatologia Brasileira*, Viçosa, MG, v. 26, p. 660-661, 2001.
- Grose, S. O.; Olmstead, R. G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. I.(Bignoniaceae). *Systematic Botany*, v. 32, n. 3, p. 660-670, 2007.
- Ibrahim, J. A. et al. Comparative studies on *Khaya. A. Juss* (Meliaceae) in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 11, 2006.
- Klock, U. et al. *Química da madeira*. Curitiba: UFPR, v. 3, 2005.
- Little, C. H. A.; Savidge, B. The role of plant growth regulators in forest tree cambial growth. *Plant Growth Regulation*, v. 6, p. 137-169, 1987.
- Martins, L.; Lago, A. A. do; Cícero, S. M. Conservação de sementes de ipê-roxo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 16, p. 108-112, 2012.

- Miller, G. L. Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- Moreira-Vilar, F. C.; Siqueira-Soares, R. D. C.; Finger-Teixeira, A.; Oliveira, D. M. D.; Ferro, A. P.; Da Rocha, G. J. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 2014.
- Oliveira, J. S. L. Uso de regulador de crescimento via foliar em milho. FAMA, Vilhena, RO, 2019.
- Philipp, P.; D’Almeida, M. L. O. Celulose e Papel. Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – Centro Técnico em celulose e papel. São Paulo, vol. I, 2 ed. 1988.
- Pinheiro, A. L. et al. Ecologia, silvicultura e tecnologia de utilização dos mognos-africanos (*Khaya spp.*). Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Agrossilvicultura, 2011.
- PGAU - Plano de Gestão da Arborização Urbana. Prefeitura de Maringá, PR: Disponível em: <<http://www.maringa.pr.gov.br/sistema/arquivos/9766d9d24016.pdf>>. Acessado em: 09 jul. 2022.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. Biologia vegetal. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 906, 2001.
- Ribeiro, A.; Filho, A. C. F.; Scolforo, J. R. S. O Cultivo do Mogno Africano (*Khaya spp.*) e o Crescimento da Atividade no Brasil. *Floresta e Ambiente*, v. 24, p. e00076814, 2017.
- Rodrigues, J. D.; Fioreze, S. L. Reguladores são, para muitos cultivos, indispensáveis ao alcance de bons níveis. *Visão Agrícola*, v. 13, n. 1, p. 35-39, 2015.
- Rodrigues, R. C. G.; Davide, A. C.; Rocha, J. M. F. Indicadores de maturidade fisiológica de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). *Cerne*, v. 8, n. 2, p. 84-91, 2002.
- Sabadini, J. C. Arborização urbana e a sua importância à qualidade de vida. *Revista Jus Navigandi*, ISSN 1518-4862, 2022.
- Santarosa, E. Alterações anatômicas do sistema vascular em porta-enxertos de videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, n. 4, p. 320-329, 2016.

- Savidge, R. A.; Wareing, P. F. Plant growth regulators and the differentiation of vascular elements. In: Barnett J. R. (ed). Xylem cell development. Castle House, Tunbridge Wells, p. 192-235, 1981.
- Sena, J. O. A.; Castro, P. R. C; Kluge, R. A. Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal. EDUEM, 2019.
- Souza, C. A. M.; Oliveira, R. B.; Martins Filho, S.; Souza Lima, J. S. Crescimento em campo de espécies florestais em diferentes condições de adubações. *Ciência Florestal*, v. 16, n. 3, p. 243-249, 2006.
- Taiz, L., Zaiger, E. M. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. Artmed Editora, 2017.
- Tucker G. A.; Roberts J. A. Plant Hormone Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2000.
- Walker, J. C. F. The drying of timber. In: Primary Wood Processing. Springer, Dordrecht. p. 247-284, 1993.
- Zhang, L.; Tsuzuki, T.; Wang, X. Preparation of cellulose nanofiber from softwood pulp by ball milling. *Cellulose*, v. 22, p. 1729-1741, 2015.

Artigo de pesquisa completo

Aceleração do crescimento de mudas de *Eucalyptus urograndis* por meio da engenharia fisiológica

Fábio Vieira Salatta, Wanderley Dantas dos Santos

Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Laboratório de Bioquímica de Plantas, 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

Autor para correspondência: FVS (fabios15@hotmail.com); WDS (wdsantos@uem.br)

(Tel +55 44 3026 4717)

Este manuscrito foi preparado seguindo as normas para submissão do jornal *Plant Physiology and Biochemistry* (JCR: 5,437)

<https://www.sciencedirect.com/journal/plant-physiology-and-biochemistry>

RESUMO

O crescimento da demanda por produtos derivados da madeira está impulsionando a silvicultura com reflorestamento de espécies lenhosas de alta produtividade e ciclo de corte relativamente curto. O *Eucalyptus* é o gênero mais difundido no Brasil, devido às suas diversas propriedades físico-químicas, rápido crescimento e adaptabilidade ao clima e solo brasileiro. Esta parte do projeto visa estudar o efeito sinérgico da giberelina e auxina aplicadas juntas e separadamente, para promover o crescimento e desenvolvimento vegetal e a lignificação. Mudanças de *Eucalyptus urograndis* foram cultivadas e tratadas com 50, 100 e 150 μM de GA_3 ; 5 e 10 μM de AIA; 100 μM GA_3 + 5 μM AIA e 100 μM GA_3 + 10 μM AIA. A giberelina isoladamente e associada à auxina promoveu alongamento de caule, ganho de biomassa seca de caule e raiz e incremento de lignina. A sacarificação foi aumentada no tratamento com giberelina o que seria desejável pela indústria de papel e celulose. O melhor tratamento para indução do crescimento foi o que usou GA_3 100 μM + AIA 5 μM .

Palavras chaves: reflorestamento, eucalipto, produção de mudas, crescimento, lignina

ABSTRACT

Growing demand for wood products is boosting forestry with reforestation of high-yield woody species and a relatively short cutting cycle. Eucalyptus is the most widespread genus in Brazil, due to its diverse physicochemical properties, rapid properties and adaptability to the Brazilian climate and soil. This part aims to study the synergist of the design gibe auxin applicator and used for development, to promote plant development and lignification. *Eucalyptus urograndis* seedlings were cultivated and treated with 5, 100 and 150 μM of GA3; 5 and 10 μM AIA; 100 μM GA3 + 5 μM AIA and 100 μM GA3 + 10 μM AIA. Gibberellin increases alone and associated with auxin promoted stem elongation, gain of stem dry biomass and lignin root. Saccharification was increased in the treatment with gibberellin or what would be the compensation by the pulp and paper industry. The best treatment for growth induction was with 100 μM GA3 + 5 μM AIA.

Keywords: reforestation, eucalyptus, seedling production, growth, lignin

Introdução

O aumento do consumo de produtos florestais tem impulsionado o crescimento dos setores de reflorestamento e florestamento no Brasil com espécies de alta produtividade e ciclo de corte relativamente curto (Araújo et al., 2021; Costa et al., 2018). Nesse contexto, as espécies do gênero *Eucalyptus* se destacam como as mais cultivadas no país, em razão dos diversos produtos que elas permitem obter (De Carvalho et al., 2018). A área para cultivo de eucaliptos é crescente a cada ano, mas para o estabelecimento de bons povoamentos florestais, a utilização de mudas de qualidade é um dos aspectos mais importantes (Wendling et al. 2021). Portanto, é necessário produzir mudas capazes de suportar as condições adversas encontradas em áreas de reflorestamento e com crescimento satisfatório.

Mudas com melhor padrão de qualidade têm maior taxa de sobrevivência após o plantio, bem como melhor crescimento e desenvolvimento, reduzindo a frequência de tratamentos culturais de manutenção e garantindo um produto de boa qualidade com menor custo (Hope et al 2004; Moura et al., 2003). Isso levou à necessidade de produção de mudas em maior escala, devido a essa crescente demanda por produtos florestais, o que conseqüentemente aumentou o número de viveiros e a adoção de sistemas mecanizados de produção (De Carvalho et al., 2018; Wendling et al., 2021). Essa demanda pressiona por novas metodologias capazes de aumentar e melhorar a produção de mudas, e o uso de bioestimulantes pode ser uma ferramenta útil para suprir a necessidade de produção de grandes quantidades de mudas em um curto espaço de tempo, para atender aos plantios comerciais (Leone, 2019; Wendling et al., 2021).

Silvicultura

A crescente população mundial resulta anualmente em maior demanda por alimentos, fibras e energia. Como resultado, a necessidade por matérias-primas está aumentando rapidamente. Entre essas matérias-primas está a madeira, presente em todos os domicílios, ruas e comércios, na forma de móveis, papel e diversos outros produtos (Cripriani, 2019). Nesse cenário, o Brasil é bastante competitivo no mercado de produtos florestais devido às características de solo e clima, e ao desenvolvimento tecnológico obtido na área, embora ainda tenha muitos pontos a serem melhorados, exigindo uma busca constante por inovações no campo da silvicultura moderna. No momento atual, a silvicultura é responsável por mais de 70% da produção de madeira no país, com aproximadamente 9,85 milhões de hectares de florestas plantadas até 2018 (Juvenal et al., 2002; Cripriani, 2019).

A produção insuficiente e demorada de mudas nativas e exóticas são alguns dos problemas que impactam diretamente a silvicultura, limitando e interferindo na crescente demanda por madeira e seus derivados. Para essa produção de mudas em larga escala destinada a plantios comerciais, recuperação de áreas degradadas e restauração florestal, é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias envolvendo cultivo eficiente, bom desenvolvimento do campo e redução dos custos de manejo em viveiros (Souza, 2006).

Eucalipto

O eucalipto (*Eucalyptus ssp.*) pertence à família *Myrtaceae* (Sub-família *Leptospermoidae*), e sua origem vem da Austrália, Tasmânia e outras ilhas da Oceania, com mais de 700 espécies reconhecidas botanicamente (Higa et al., 2000). Esse gênero de árvore foi trazido para o Brasil em 1904 para a fabricação de lenhos, dormentes e postes das estradas de ferro na região Sudeste. Desde a década de 20, é utilizado como matéria prima no abastecimento das fábricas de papel e celulose, de siderúrgicas e na produção de carvão vegetal, devido às suas diversas propriedades físico-químicas, rápido crescimento e adaptabilidade ao o clima e solo brasileiro (Dossa et al., 2002; Schumacher et al., 2005).

Atualmente, no Brasil, o eucalipto possui grande importância econômica e seu plantio representa 72% de todas as árvores comerciáveis plantadas, ocupando uma área de 5,7 milhões de hectares, com média de 35,7 m³/ha/ano e crescimento anual de 2,4% (IBA, 2017). As espécies mais plantadas são: *E. grandis*, *E. saligna*, *Eucalyptus alba*, *E. botryoides*, *E. camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. maculata*, *E. longifolia*, *E. robusta*, *E. umbellata*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. microcorys*, *E. pilularis*, *E. trauti* e *E. viminalis* (Schumacher et al., 2005; IBA, 2017)

De maneira geral, o gênero *Eucalyptus* apresenta madeira mais dura (hardwoods), pesada, resistente, com textura fina e baixa estabilidade dimensional, sendo representado por árvores de crescimento rápido, com troncos retos e podas naturais. Sua madeira possui grandes variações de propriedades físicas, adaptadas às mais variadas condições de uso (Record e Hess, 1949). Quanto ao tempo de cultivo, o eucalipto pode ter o corte efetuado a partir dos 7 anos, quando destinado à produção de lenha e carvão, embora a idade econômica seja entre o 8º e 9º anos. Quando destinado à exploração do lenho como madeira (móveis, construção civil, etc), de 15 a 40 anos (Higa et al., 2000; Schumacher et al., 2005).

Madeira

A madeira da árvore possui diferentes regiões macroscópicas, com funções estruturais e de sobrevivência, como cerne, alburno, câmbio, casca interna (floema) e casca externa. A região mais interna do tronco é o cerne, que é composto por espessas células mortas, altamente impregnadas com lignina e extrativos. O alburno, região que envolve o cerne, é responsável pela condução de água e solutos no interior da árvore, constituído por células vivas. O câmbio é uma fina camada, responsável pelo crescimento em diâmetro da árvore, formada por células meristemáticas. Na região mais externa do tronco, encontram-se a casca interna, onde ocorre a condução da seiva, e a casca externa, que tem a função de proteger as regiões mais internas (Burger e Ritcher, 1991).

A composição microscópica da madeira é definida como um biopolímero heterogêneo, constituído principalmente por suas células espessas compostas de celulose, hemiceluloses e lignina, que formam todos os tecidos, e sua integridade estrutural é atribuída à lamela média, que é uma camada que contém as células adjacentes unidas, altamente lignificadas. (Fengel et al., 1989; Desch et al., 1996; Rowell et al., 2005; Lepage et al., 1986). Em termos de ultraestrutura, a parede celular dos tecidos que formam a madeira é constituída por diferentes camadas: parede primária (P), parede secundária externa (S1), parede secundária média (S2) e parede secundária interna (S3) (Figura 2). Essas camadas são compostas por microfibrilas celulósicas, que se dispõem no espaço de forma definida, dependendo da camada. (Fengel et al., 1989; Ramos et al., 2003).

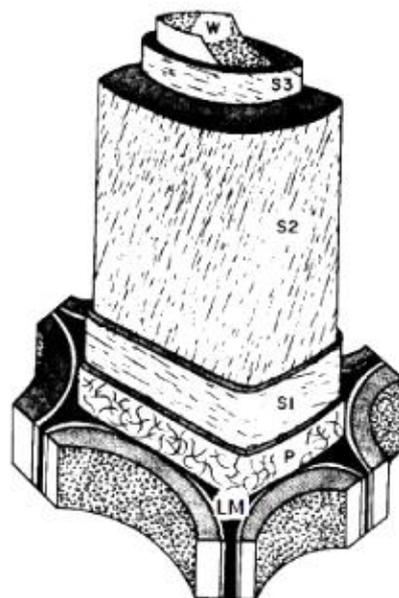


Figura 1 – Diagrama esquemático da formação da parede celular com crescimento secundário. LM, lamela média. P, parede primária. S1, parede secundária externa. S2, parede secundária média. S3, parede secundária interna. W, ‘verrugas’ (warts) invaginações da parede no protoplasto que ocorrem logo antes da sua completa desintegração (CARPITA e McCANN, 2000).

Os componentes da parede celular (celulose, hemicelulose, lignina e extrativos) possuem proporções que vão depender da espécie vegetal e variam de camada para camada. Em geral, o teor de lignina encontrado em madeiras duras é de 18-25%, sendo que a maior parte dessa lignina se encontra na lamela média, e em menor proporção na parede secundária, e à medida que as paredes celulares se desenvolvem, a lignina é incorporada como o último componente, interpenetrando-se entre as fibrilas e, assim, as paredes celulares enrijecem. A celulose corresponde próximo a 45% do total dos componentes fortalecendo, enrijecendo as paredes celulares. Celulose e a hemicelulose a 30% (Klock et al., 2005; Rowell et al., 2005).

Auxina

O ácido indol-3-acético (AIA) é a principal auxina das plantas e ocorre principalmente em órgãos em crescimento ativo, como meristemas apicais, folhas jovens, frutos em desenvolvimento e sementes, sendo os principais sítios de síntese. Embora a auxina também possa ser produzida em folhas maduras e ápices radiculares, o nível de produção nesses tecidos é geralmente baixo (Uggla et al., 1996; Taiz e Zaiger, 2017). As auxinas são essenciais para o crescimento das células vegetais, promovendo a divisão e expansão celular, pois está envolvida na incorporação de materiais na parede celular que afetam a plasticidade da célula. Dentre suas inúmeras funções, participa principalmente na promoção do crescimento do caule, além de regular a dominância apical, iniciação radicular lateral, abscisão foliar, diferenciação vascular, formação de gemas florais e desenvolvimento de frutos (Morris et al., 2010; Uggla et al., 1996).

A síntese do AIA origina-se principalmente a partir do triptofano e seu transporte ocorre de forma unidirecional do ápice para as raízes através do sistema de floema, ou através de um sistema de transporte polar ativo complexo e bem coordenado de célula para célula por todo o corpo da planta. Como a principal fonte de auxina é o meristema apical, esse transporte polar da parte aérea para as raízes contribui para a formação de um gradiente de concentração decrescente do hormônio. Este gradiente longitudinal de auxina que controla alguns dos processos na planta, incluindo alongamento do caule, dominância apical, cicatrização de feridas e senescência foliar (Sundberg et al., 2000; Zhong et al., 2009).

Os sistemas de produção de mudas mais utilizados no Brasil são de plantas cultivadas a partir de sementes e através do enraizamento de estacas (plantios clonais) (Simões et al., 1987). Porém, no sistema de produção através da estaquia convencional, apresenta problemas com o baixo porcentual de enraizamento de alguns clones e as dificuldades inerentes aos tratamentos culturais, como irrigação, fertilização e controle de fitopatógenos, principalmente em períodos chuvosos,

além do lento crescimento, característica comum entre as plantas lenhosas (Silva, 2018; Xavier et al., 2010). O objetivo deste capítulo foi analisar e apresentar o efeito dos hormônios vegetais sobre o desenvolvimento de mudas de eucalipto, com foco na ação conjunta dos hormônios auxina e giberelina no processo de crescimento e desenvolvimento, lignificação e sacarificação.

Materiais e métodos

Cultivo

Mudas de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) com aproximadamente 30 dias em tubetes de 290 ml contendo substrato de casca de pinus e adubo, foram obtidas comercialmente, e o experimento foi realizado em casa de vegetação dentro do Centro de Treinamento em Irrigação da UEM. Os tratamentos com GA₃ e AIA foram realizados nas concentrações de 50, 100 e 150 µM de GA₃; 5 e 10 µM de AIA µM e, 100 µM GA₃ + 5 µM AIA e 100 µM GA₃ + 10 µM AIA, e o mesmo tratamento foi reaplicado após 30 dias. No 90º dia, as plantas foram coletadas para análise biométrica e posteriormente preparadas para análises bioquímicas, secando o material em estufa a 50°C e macerando em moinhos do tipo faca e bola, respectivamente.

Determinação dos parâmetros biométricos

As plantas tiveram seu crescimento aferido, determinando-se a altura das plantas e diâmetro dos caules com auxílio de fita métrica e paquímetro. As biomassas do caule, folha e raiz foram pesadas frescas, secas a 50°C e pesadas.

Determinação da lignina

O protocolo utilizado para quantificar a lignina foi realizado após a preparação dos tecidos para excluir proteínas e outros componentes da parede celular. Esta remoção é essencial para evitar a interferência destes compostos.

Preparação de parede celular sem proteína

As amostras secas (0,3 g) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM (7 ml, pH 7,0) usando gral e pistilo e depois transferidas para um tubo de centrífuga. A suspensão foi centrifugada (1,400 xg, 4 min), lavada por agitação sucessiva e centrifugada como se segue: oito vezes com tampão fosfato de potássio (pH 7,0; 7 ml), quatro vezes com Triton X-100 a 1% (v / v) em tampão pH 7,0 (7 ml), seis vezes com NaCl 1 M em tampão pH 7,0 (7 ml), três vezes com água destilada (7 ml) e duas vezes com acetona PA (5 ml). O pellet foi seco em estufa (60 °

C, 24 h) e arrefecido em dessecador a vácuo. A matéria seca obtida foi definida como a fração da parede celular sem proteína (Ferrarese et al., 2002).

Lignina total

As amostras de parede celular livre de proteína (20 mg) foram colocadas em tubos de centrífuga de tampa roscada contendo 0,5 ml de brometo de acetilo a 25% (v / v em ácido acético PA) e incubadas a 70 ° C por 30 min. Após a digestão completa, as amostras foram rapidamente arrefecidas em banho de gelo e então misturada com 0,9 ml de NaOH 2 M, 0,1 ml de hidroxilamina-HCl 5 M e 6 ml de ácido acético PA suficiente para solubilização completa do extrato de lignina. Após centrifugação (1.400 × g, 4 min), a absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm. Uma curva padrão foi gerada com lignina alcalina (Aldrich 37, 096-7). Os resultados expressos em mg lignina g⁻¹ de parede celular (Moreira-Vilar et al., 2014).

Determinação sacarificação enzimática

O protocolo utilizado para realizar a sacarificação enzimática foi realizado após a preparação dos tecidos para a retirada de açúcares solúveis da biomassa. A sacarificação é a determinação da glicose livre após o uso de enzimas específicas para quebrar as ligações β-1,4 da celulose.

Preparação da biomassa isenta de açúcares solúveis

Amostras secas (300 mg) em telas de nylon semipermeáveis foram colocadas no sistema de refluxo Soxhlet com etanol puro (Freitas et al., 2018), por aproximadamente 10h. Em seguida, as biomassas foram transferidas para estufa a 60 °C.

Quantificação de açúcares redutores

Em Eppendorf de 2 ml, foi pesado 10 mg da biomassa isenta de açúcares solúveis, adicionou-se 10 µl do coquetel enzimático celulolítico (Novozymes – NS 22086) e completado para 1 ml com tampão acetato de sódio pH 5,0. Após incubação a 50 °C por 4h e 24h de reação, 100 µl do sobrenadante foram coletados em tubos de ensaio, adicionados 100 µl do reagente DNS 1%, e incubado a 100 °C por 5 min. Completado com 800 µl do tampão acetato de sódio, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Para o branco, foram utilizados 100 µl do DNS 1% e 900 µl do tampão fosfato de sódio. Os resultados foram expressos com a quantificação de glicose livre em mg g⁻¹ de biomassa (Miller, 1959).

Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). O teste Dunnett e Test t de Student foram realizados com o programa GraphPad *Prism 5.0* (San Diego, Califórnia) para verificar as significâncias das diferenças entre os parâmetros avaliados, valores de $0.05 \geq P \geq 0.01$ serão representados por "*", valores de $0.01 \geq P \geq 0.001$ serão representados por "**", e valores de $0.001 \geq P$ serão representados por "***" sendo todos considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Após a determinação das concentrações de GA₃ nos cultivos de ipê roxo e mogno africano, foi realizado o experimento com mudas de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) em tubetes, para estudar a ação sinérgica da giberelina (GA₃) com auxina (AIA). Duas aplicações mensais foram realizadas durante um período de 4 meses, com os seguintes tratamentos: 50, 100 e 150 μ M de GA₃; 5 e 10 μ M de AIA μ M e, 100 μ M GA₃ + 5 μ M AIA e 100 μ M GA₃ + 10 μ M AIA. O resultado foi que todos os tratamentos com giberelina promoveram crescimento significativo das plantas, aumentaram DAB e biomassa seca do caule. Além disso, todos os tratamentos obtiveram aumentos uniformes significativos na biomassa seca das raízes. Entretanto, a biomassa seca das folhas não apresentou variações significativas.

Os melhores resultados em termos de crescimento caulinar do eucalipto foram obtidos com os tratamentos com GA₃ + AIA, seguidos dos tratamentos apenas com GA₃. Os tratamentos contendo apenas AIA não produziram resultados estatisticamente significativos. Os resultados com GA 100 + AIA 5 μ M e GA 100 + AIA 10 μ M foram com aumentos de 241,33% e 223,16%, respectivamente, em relação ao controle. Os tratamentos com GA₃ 50, 100 e 150 μ M promoveram aumentos de 166,15%, 184,79% e 225,77%, respectivamente, em comparação ao controle (Figura 1A).

As médias do DAB de todos os tratamentos (50, 100 e 150 μ M de GA₃; 5 e 10 μ M de AIA μ M; GA₃ 100 μ M + AIA 5 μ M e GA₃ 100 μ M + AIA 10 μ M) apresentaram aumentos significativos, com valores de 43,57%, 69,40%, 64,66%, 40,15%, 41,54%, 64,34% e 61,29%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 1B). A biomassa seca do caule de eucalipto não apresentou resultados estatisticamente significantes apenas nos tratamentos com AIA. As concentrações de GA₃ 50, 100 e 150 μ M tiveram os valores de 58,62%, 75,86% e 93,11%,

respectivamente, de aumento em relação ao controle, e os valores com os tratamentos com GA 100 + AIA 5 μM e GA 100 + AIA 10 μM foram de 88,28% e 80,69% de aumento (Figura 1C).

As folhas também não apresentaram variações estatisticamente significativas, mas é possível observar uma tendência de aumento principalmente nas concentrações GA 150 μM (18,34%) e GA 100 + AIA 5 μM (18,03%) (Figura 1D). Quanto aos valores de biomassa seca da raiz, todos os tratamentos tiveram aumentos significativos, entre 18,44% e 28,83% em relação ao controle (Figura 1E).

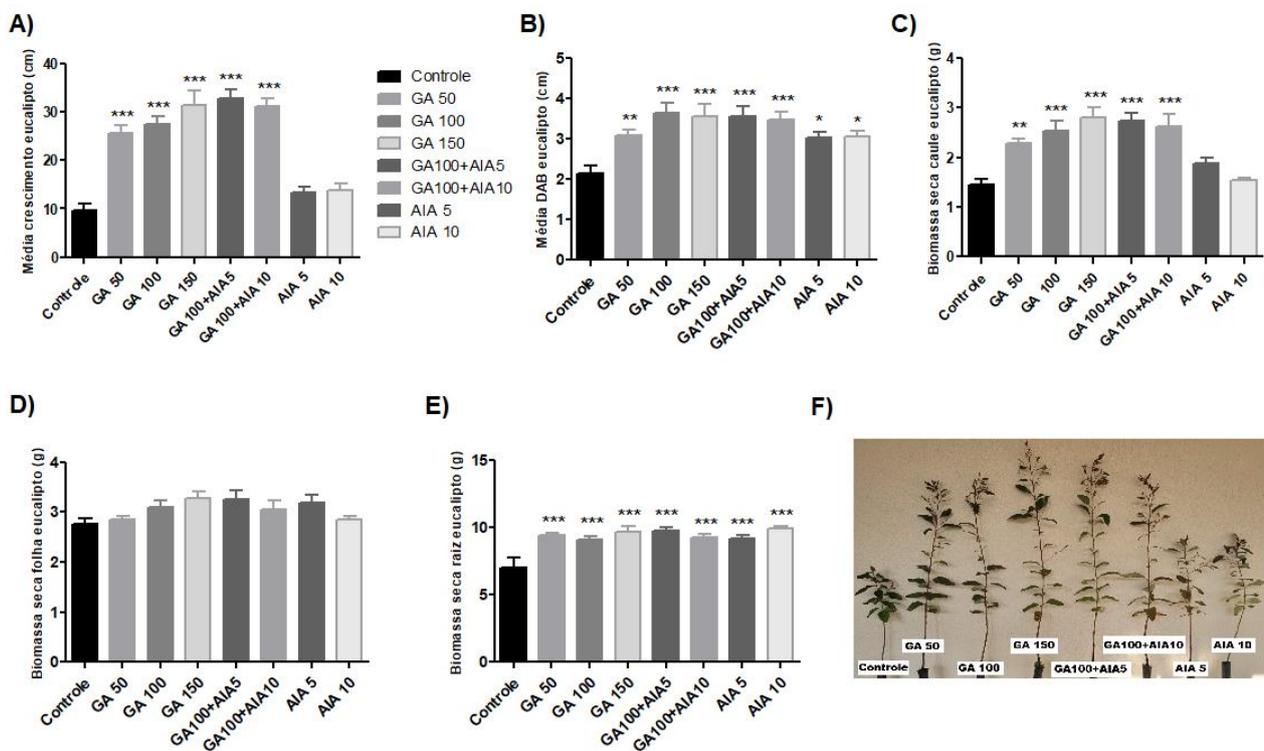


Figura 2. Parâmetros biométricos de eucalipto tratado com GA₃ e AIA em pleno sol, ao longo de 4 meses. A) Crescimento médio do eucalipto. B) Gráfico do DAB médio do eucalipto em pleno sol, durante um período de 4 meses (cm). C, D e E) Gráfico da biomassa seca do caule, folhas e raiz (eucalipto) do controle e dos tratamentos com GA₃ e AIA (g). F) Foto do eucalipto do controle com os tratamentos de GA₃ e AIA. Barras de erro indicam as médias \pm EPM, n = 10. Teste de Dunnet: *0.05 \geq P \geq 0.01, **0.01 \geq P \geq 0.001, ***0.001

A lignina no caule do eucalipto aumentou significativamente nas concentrações de 50 e 150 μM de GA₃ e 100 μM de GA₃ + 10 μM de AIA, em 32,74%, 44,91% e 37,98%, em relação ao controle, com valores de 259,61, 283,41 e 269,86 mg/g de lignina, para os respectivos tratamentos (Figura 2A). A sacarificação foi elevada apenas nos tratamentos contendo GA₃, com aumento significativo na produção de glicose livre em 4h de 33,56% e 24h de 17,79% na concentração de 150 μM de GA₃ (Figura 2B e 2C).

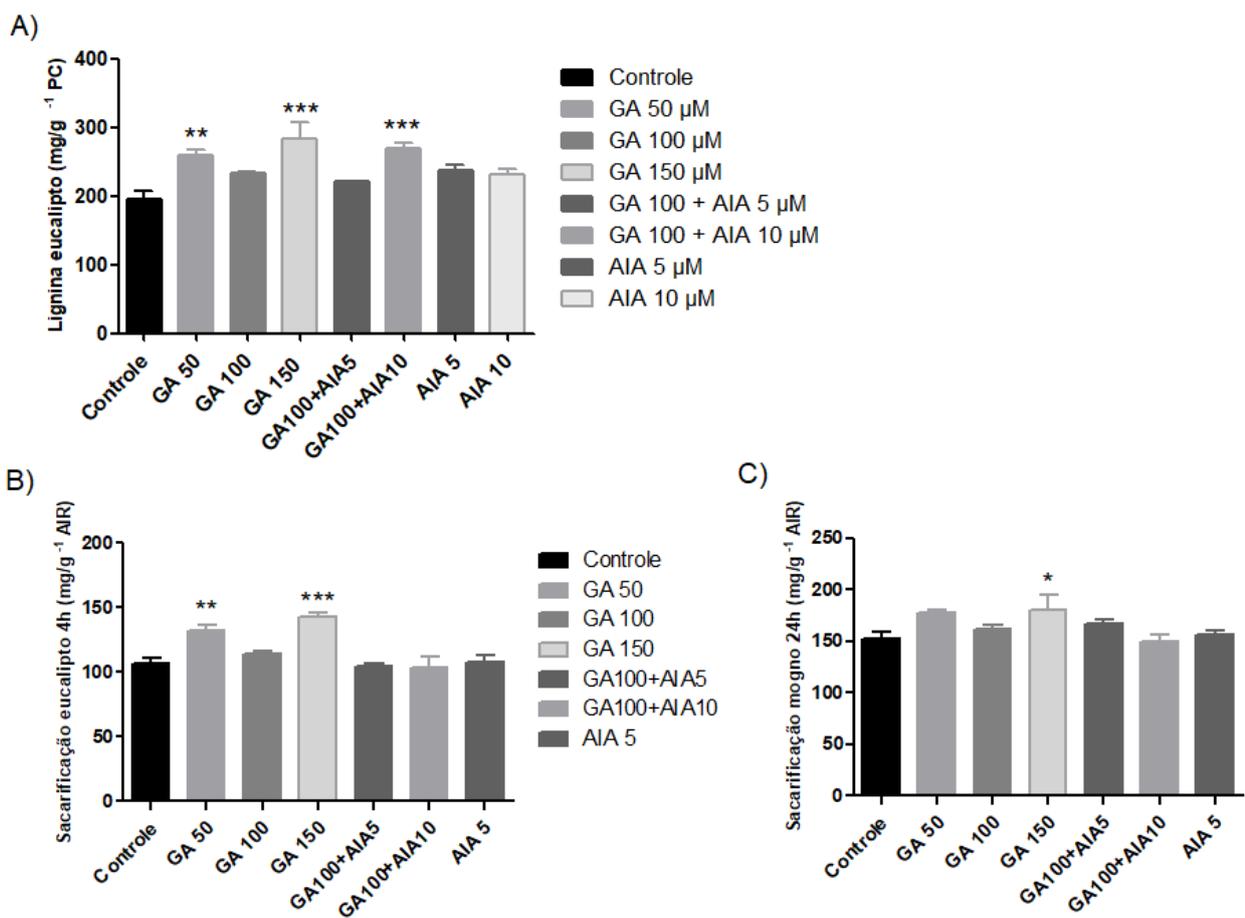


Figura 3. Teor de lignina e sacarificação de eucalipto tratado com reguladores vegetais. A) Teor total de lignina da biomassa do caule de eucalipto. B e C) Sacarificação da celulose em glicose 4 h (esq.) e 24 h (dir.). Barras indicam valores médios ± EPM, n = 10. Teste de Dunnet: *0.05 ≥ P ≥ 0.01, **0.01 ≥ P ≥ 0.001, ***0.001 ≥ P.

Discussão

O gênero *Eucalyptus ssp.* contribuiu generosamente para a expansão da silvicultura nas últimas décadas no Brasil, impulsionando o setor, principalmente para a produção de celulose e papel. Sua fácil adaptabilidade ao solo e ao clima brasileiro, a variabilidade de suas propriedades físico-químicas, e o rápido crescimento, fizeram do eucalipto a árvore mais plantada em termos de reflorestamento. Conseqüentemente, houve um aumento na demanda pela produção de mudas de eucalipto, mas devido a algumas limitações, principalmente ligadas ao lento crescimento dessas plantas lenhosas, faz-se necessário a busca de novas metodologias para aumentar esta produção e melhorar o padrão de qualidade destas mudas, visando maior taxa de sobrevivência após o plantio. Portanto, o uso de bioestimulantes pode ser uma ferramenta útil para suprir a necessidade de

produzir grandes quantidades de mudas em um curto período de tempo, para atender plantios comerciais (De Carvalho et al., 2018; Hope et al 2004; Moura et al., 2003; Wendling et al., 2021).

Assim como ocorreu com o ipê-roxo e o mogno africano, o GA₃, quando aplicado exogenamente por aspersão foliar, foi capaz de acelerar o crescimento e o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus urograndis* cultivadas em tubetes de 290 ml durante um período de 4 meses. Já o GA₃ associado ao AIA, apresentou resultados positivos ainda mais significativos, quando comparados aos resultados do GA isolado. A ação sinérgica de GA₃ + AIA proporcionou aumento no crescimento e DAB do caule, e aumento na biomassa seca do caule e raiz, com destaque para o tratamento com GA₃ 100 + AIA 5 µM.

A ação dos hormônios vegetais de forma isolada em plantas superiores já é bem relatada na literatura, mas estudos de ação sinérgica em entre hormônios no tratamento de plantas lenhosas de lento crescimento são escassos. Demonstramos que GA associado ao AIA pode ser uma forte metodologia para aumentar a produção de mudas de eucalipto, reduzindo o tempo de cultivo em viveiros, e isso pode ser explicado devido que a divisão, diferenciação e expansão celular podem ser induzidos tanto pela giberelina quanto pela auxina, que são hormônios vegetais essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas por mecanismos diferentes. Em geral, a giberelina está associada principalmente ao alongamento do caule e a auxina ao desenvolvimento de outros tecidos e órgãos vegetais, como caules, raízes, folhas e gemas. (Savidge et al., 2000; Taiz e Zaiger, 2017). O uso desses dois hormônios em conjunto neste trabalho demonstrou que eles podem atuar sinergicamente para promover o desenvolvimento do eucalipto quando comparado a uma planta não tratada, demonstrado com aumento no crescimento do caule e DAB, e ganho de biomassa seca do caule e raiz.

Além disso, em nossos tratamentos, a giberelina aplicada isoladamente ou associada à auxina induziu aumento de lignina no conteúdo do caule, porém, apenas GA₃ e AIA quando aplicadas juntas, apresentaram aumento da sacarificação indicando que ambos os hormônios quando fornecidos em conjunto exogenamente, alteram a forma como a célula promove a lignificação e a plasticidade celular. Na literatura, a giberelina e a auxina são os principais hormônios envolvidos no processo de xilogênese (diferenciação celular e lignificação). Diversos hormônios estão envolvidos no processo de xilogênese, no entanto, giberelinas e auxinas parecem desempenhar o papel mais proeminente na formação do xilema secundário, que é um tecido altamente lignificado (Bradley e Crane, 1957; Dalessandro et al., 1971; McKenzie et al., 2011). Verificou-se que a giberelina quando associada à auxina pode promover a formação de uma mistura de fibras e vasos, e a auxina sozinha promove apenas vasos, portanto, a giberelina pode ser considerada um fator essencial para a formação de fibras (Aloni et al., 2000; Dalessandro et

al., 1971). A giberelina aplicada isoladamente, observa-se apenas a divisão celular cambial, mas não a xilogênese, evidenciando assim o papel da AIA em estimular a diferenciação de células derivadas do xilema (Wareing et al., 1964; Bjorklund et al., 2007). Em estudo com *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, os resultados analisados permitiram observar que a aplicação de GA₃ e AIA via pulverização foliar promoveu maior crescimento das plantas em altura e aumento do teor de matéria seca nos compartimentos lenhosos, enquanto a aplicação de hormônios via sistema radicular promoveu um aumento no teor de matéria seca radicular (Mauri et al., 2016).

Alguns estudos na área da agronomia com aplicação exógena de GA e AIA, isoladamente e em conjunto, foram conduzidos com o intuito de elucidar suas ações no corpo vegetal, e foi demonstrado que constantemente a aplicação conjunta de AIA e GA promoveu maior crescimento da planta e desenvolvimento, o que propiciou seu uso em plantas de interesse agrônomico (Zogonel et al., 2007). No entanto, no setor florestal, com exceção dos processos de propagação tecidual *in vitro* e enraizamento por estaquia, ainda não há uso de hormônios como prática silvicultural para aumentar a produtividade e a qualidade da madeira. Para que a aplicação exógena de AIA e GA se torne uma prática silvicultural, é necessário determinar as concentrações e proporções ideais desses hormônios por meio de experimento dose-resposta. Para verificar a sensibilidade das plantas às dosagens hormonais, a proporção escolhida foi de 1:10 (auxina:giberelina). A proporção entre os hormônios foi estipulada com base em Aloni (1985) que afirma que, em plantas intactas, as proporções de 1:5 a 1:20 (auxina:giberelina) apresentam resultados satisfatórios, sendo a proporção de 1:10 a melhor.

Conclusão

A aplicação conjunta de giberelina e auxina impulsionou o desenvolvimento e crescimento das mudas de *Eucalyptus urograndis*. Os reguladores de crescimento também aumentaram os teores de lignina no caule, sendo a lignina uma macromolécula fundamental da parte estrutural da parede celular, e importante para o desempenho em campo de mudas destinadas à silvicultura. Por outro lado, o tratamento com GA₃ 150 µM promoveu, sozinho, resultados similares aos dos tratamentos conjunto com AIA. Além disso, esse tratamento foi o que induziu o maior aumento na biomassa e no conteúdo de lignina do caule e, paradoxalmente, maior sacarificação, o que é desejável para a indústria de papel e celulose, entre outras aplicações biotecnológicas.

Referências

- Aloni, R. Plant growth method and composition. U.S. Patent n. 4,507,144, 1985.
- Aloni, R. Hormonal control of vascular differentiation in plants: the physiological basis of cambium ontogeny and xylem evolution. Cell and molecular biology of wood formation, p. 223-236, 2000.
- Araújo, J. B. C. N. Análise do mercado brasileiro de carvão vegetal. 177 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2021.
- Björklund, S. Cross-talk between gibberellin and auxin in development of Populus wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. The Plant Journal, v. 52, n. 3, p. 499-511, 2007.
- Bradley, M. V.; Crane, J. C. Gibberellin-stimulated cambial activity in stems of apricot spur shoots. Science, New York, v. 126, p. 972-973, 1957.
- Costa, D. B.; Streck, N. A. Duração da fase de mudas em eucalipto simulada em cenários de aumento de temperatura. Ciência Florestal, v. 28, p. 1263-1270, 2018.
- Dalessandro, G.; Roberts, L. W. Induction of xylogenesis in pith parenchyma explants of Lactuca. Am J Bot, v. 58, p. 378-385, 1971.
- De Carvalho, S. A. A sustentabilidade econômica, social, ambiental e ecológica do reflorestamento de florestas nativas ou naturais¹. Temas Contemporâneos do Direito, p. 123, 2018.
- Desch, H. E.; Dinwoodie, J. M. Timber: structure, properties, conversion and use. Macmillan International Higher Education, 2016.
- Dossa, D. Produção e rentabilidade do eucaliptos em empresas florestais. Embrapa Florestas- Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2002.
- Fengel, D.; Wegener, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed, v. 23, p. 601, 1989.
- Ferrarese, M. L. L.; Zottis, A.; Ferrarese-Filho, O. Quantificação de lignina livre de proteína em raízes de soja (*Glycine max*). Biol. v. 57, p. 541-543, 2002.

- Higa, R. C. V.; Mora, A. L.; Higa, A. R. Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii*. Embrapa Florestas. Documentos, 2000.
- Juvenal, T. L.; Mattos, R. L. G. O setor florestal no Brasil e a importância do reflorestamento. 2002.
- Klock, U. et al. Química da madeira. Curitiba: UFPR, v. 3, 2005.
- Leone, G. F. Otimização da produção de mudas clonais de eucalipto com o uso de bioestimulantes. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo – SP, 2019.
- Mauri, R. Efeito e detecção de reguladores de crescimento no lenho de Eucalipto. 160 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- Miller, G. L. Modified DNS method for reducing sugars. Anal Chem, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- McKenzie, R. R.; Deyholos, M. K. Effects of plant growth regulator treatments on stem vascular tissue development in linseed (*Linum usitatissimum* L.). Industrial Crops and Products, London, v. 34, n. 1, p. 1119-1127, 2011.
- Moreira-Vilar, F. C.; Siqueira-Soares, R. D. C.; Finger-Teixeira, A.; Oliveira, D. M. D.; Ferro, A. P.; DA ROCHA, G. J. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods. PLoS ONE, v. 9, p. 10, 2014.
- Morris, D. A.; Friml, J.; Zazimalová, E. The functioning of hormones in plant growth and development: the transport of auxins. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! Ithaca: Springer, p. 451-484, 2010.
- Moura, V. P. G.; Guimarães, D. P. Produção de mudas de *Eucalyptus* para o estabelecimento de plantios florestais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2003.
- Record, S. J.; Hess, R. W. Timbers of the new world. 1949.
- Savidge, R. A. Intrinsic regulation of cambial growth. Plant Growth Regulation, Dordrecht, v. 20, p. 52-77, 2000.

- Silva, M. D. G. Desempenho de cepas de materiais genéticos de eucalipto em jardim clonal. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – RJ, 2018.
- Simões, J. W. Problemática da produção de mudas em essências florestais. Piracicaba: IPEF, 1987.
- Sundberg, B. Cambial growth and auxin gradients. Cell and molecular biology of wood formation, p. 169-188, 2000.
- Souza, C. A. M.; Oliveira, R. B.; Martins Filho, S.; Souza Lima, J. S. Crescimento em campo de espécies florestais em diferentes condições de adubações. Ciência Florestal, v. 16, n. 3, p. 243-249, 2006.
- Taiz, L., Zaiger, E. M. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. Artmed Editora, 2017.
- Uggla, C. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United United States of America, Washington, v. 93, p. 9282-9286, 1996.
- Wareing, P. F.; Hanney, C. E. A.; Digby, J. The role of endogenous hormones in cambial activity and xylem differentiation. New York: Academic, p. 323-344, 1964.
- Wendling, I. Produção de mudas de eucalipto. In: OLIVEIRA, E. B.; PINTO JUNIOR, JE (Ed.). O eucalipto e a Embrapa: quatro décadas de pesquisa e desenvolvimento. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 22, 2021.
- Xavier, A; Da Silva, R. L. Evolução da silvicultura clonal de Eucalyptus no Brasil. Agronomía Costarricense, v. 34, n. 1, p. 93-98, 2010.
- Zagonel, J.; Fernandes, E. C. Doses e épocas de aplicação do regulador de crescimento afetando cultivares de trigo em duas doses de nitrogênio. Planta Daninha, Viçosa, MG, v. 25, n. 2, p. 331-339, 2007.

Artigo de pesquisa completo

Crescimento acelerado de pastagem por meio da engenharia fisiológica

Fábio Vieira Salatta, Wanderley Dantas dos Santos

Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas,
Laboratório de Bioquímica de Plantas, 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

Autor para correspondência: FVS (fabios15@hotmail.com); WDS (wdsantos@uem.br)
(Tel +55 44 3026 4717)

Este manuscrito foi preparado seguindo as normas para submissão do jornal *Plant Physiology and Biochemistry* (JCR: 5,437)

<https://www.sciencedirect.com/journal/plant-physiology-and-biochemistry>

RESUMO

A pecuária cumpre um papel importante na produção de proteína alimentar. No Brasil, grande parte da pecuária utiliza pastagens como principal fonte de alimentação do gado. A braquiária é a forrageira mais difundida no Brasil devido às suas características favoráveis ao cultivo, principalmente em condições de solo de baixa fertilidade. Nós avaliamos o efeito da giberelina e auxina quando aplicadas em conjunto e separadamente. *Brachiaria decumbens* foi cultivada em vasos e tratada com 100 μM de GA_3 , 100 μM de GA_3 + 10 μM de AIA e 10 μM de AIA. Em seguida, foi realizado um experimento de campo, utilizando uma braquiária pré-existente de pasto destinado a gado leiteiro, com os tratamentos 50 μM de GA_3 e 50 μM de GA_3 + 5 μM de AIA. A giberelina isolada e associada à auxina promoveu o crescimento das plantas e incremento de lignina, mas apenas o tratamento GA_3 + AIA proporcionou aumento da biomassa fresca e seca. Mesmo com o aumento do teor de lignina total, a sacarificação não foi alterada. A proporção 1:10 de auxina e giberelina mostrou-se eficiente para o crescimento e ganho de biomassa em braquiária.

Palavras chaves: Pecuária, braquiária, pastagens, crescimento, lignina

Abstract

Livestock plays an important role in the production of dietary protein. In Brazil, a large part of livestock uses pastures as the main source of cattle feed. Brachiaria is the most widespread forage in Brazil due to its favorable characteristics for cultivation, especially in low fertility soil conditions. We evaluated the effect of gibberellin and auxin when applied together and separately. Brachiaria decumbens was grown in pots and treated with 100 μM GA₃, 100 μM GA₃ + 10 μM AIA and 10 μM AIA. Then, a field experiment was carried out, using a pre-existing brachiaria pasture intended for dairy cattle, with the treatments 50 μM of GA₃ and 50 μM of GA₃ + 5 μM of AIA. Gibberellin alone and associated with auxin promoted plant growth and lignin increment, but only the GA₃ + AIA treatment provided an increase in fresh and dry biomass. Even with the increase of the total lignin content, the saccharification was not altered. The 1:10 ratio of auxin and gibberellin proved to be efficient for growth and biomass gain in Brachiaria.

Keywords: livestock, *Brachiaria*, pastures, growth, lignin.

Introdução

Brachiaria spp é a principal forrageira utilizada na formação de pastagens no Brasil, destacando-se na pecuária e ocupando cerca de 50% das áreas de pastagem no Brasil (Hoffman et al., 2014; Silva et al., 2012). Existem aproximadamente 200 milhões de hectares de pastagens no país, dos quais estima-se que cerca de 130 milhões estão em algum estado de degradação, ou seja, com redução do vigor, o que impossibilita a recuperação natural do pasto e o deixa incapaz de sustentar os níveis de produção e qualidade requeridos. Assim, as pastagens ficam suscetíveis aos efeitos nocivos de pragas, doenças e plantas invasoras, necessitando de alguma intervenção para reverter esse estado (Borghi et al., 2018; Oliveira et al., 2022). Essa degradação é consequência de diversos fatores que podem resultar de ações isoladas ou conjuntas, como preparo incorreto do solo, escolha inadequadas de espécies forrageiras, uso de sementes de baixa qualidade, má formação inicial, manejo inadequado e, principalmente, pela não reposição de nutrientes, erosão, lixiviação e volatilização ao longo dos anos (Kichel et al., 1999).

Nesse sentido, percebe-se a necessidade de melhorar a eficiência das práticas de manejo com o objetivo de melhorar o processo de revitalização e recuperação de pastagens que foram degradadas de alguma forma, e uma dessas soluções pode ser o uso de bioestimulantes que favoreçam o crescimento, desenvolvimento e aproveitamento dessas pastagens. Os bioestimulantes, ou hormônios vegetais, são compostos químicos sintetizados pela planta ou podem ser fornecidos exogenamente, os quais são responsáveis pela comunicação entre células, tecidos e órgãos e atuam nos processos de regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas em busca da homeostase vegetal (Krahl e Marocco, 2019; Rocha et al., 2018).

Existe um grupo formado principalmente por cinco hormônios vegetais: giberelinas, auxinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. A giberelina, ou ácido giberélico (GA3) e a auxina, ou ácido indolacético (AIA) são hormônios vegetais responsáveis por exercerem sua função no crescimento e desenvolvimento das plantas, através do processo de divisão e alongamento celular, porém por mecanismos distintos. A giberelina exerce funções específicas como alongamento do caule, germinação de sementes, formação de frutos e outras propriedades como diferenciação de tecidos e órgãos, e a auxina atua principalmente em tecidos meristemáticos (Brennecke et al., 2015; Rocha, 2018; Thomas et al., 2016)

Braquiária

Entre as forrageiras cultivadas, as gramíneas do gênero *Brachiaria* são as mais utilizadas no Brasil. A *Brachiaria decumbens*, uma gramínea comumente chamada de braquiária ou braquiarinha, foi introduzida no Brasil no início da década de 1960. Disseminou-se rapidamente nas regiões de produção animal a partir da década de 1970, devido às suas características favoráveis para cultivo, especialmente em condições de solos de baixa fertilidade, normalmente encontrados nas regiões pecuárias do país (De Souza et al., 2020; Seiffert, 1980). Algumas características de destaque desta forrageira são: boa adaptabilidade a solos ácidos e pobres, presente na maioria das regiões produtoras de carne e leite, alta produção de sementes no período chuvoso, rusticidade, adaptando-se bem a diferentes condições de solo e manejo, alta capacidade de competição com plantas invasoras, boa produção de forragem, proporcionando melhor desempenho animal quando comparado a pastagens nativas/naturalizadas. No entanto, esta gramínea apresenta algumas restrições associadas à suscetibilidade a cigarrinhas-das-pastagens e fotossensibilização (Campos et al., 2007; Santos et al., 2009).

O uso de bioestimulantes na agricultura vem se intensificando, a fim de recuperar, complementar ou suprir as necessidades estruturais das culturas, principalmente quando se pensa em aumentos de produtividade, pois as plantas se tornam mais eficientes, além de outros benefícios como maior tolerância ao estresse ambiental e fitotoxicidade (Gazzoni, 2008, Vieira et al., 2001). Assim, estudamos o efeito dos hormônios vegetais no desenvolvimento da braquiária, avaliando a ação separada e conjunta da giberelina e auxina no processo de crescimento e desenvolvimento, lignificação e sacarificação. Nossos experimentos revelaram que o uso de giberelina e auxina pode desempenhar um papel importante na formação e recuperação de pastagens com níveis iniciais de degradação.

Materiais e métodos

A pesquisa foi realizada em duas etapas, inicialmente no laboratório BIOPLAN, pertencente à Universidade Estadual de Maringá, e a segunda parte, foi realizada a campo em uma fazenda de criação de gado leiteira no município de Rosário do Iváí/PR, de Latitude: 24° 13' 50" Sul, Longitude: 51° 16' 14" Oeste, onde a *Brachiaria decumbens* é cultivada em sistema de pastejo rotacionado.

Cultivo

As sementes de braquiária (*Brachiaria decumbens*) foram obtidas comercialmente. A germinação ocorreu em sala de cultivo em vasos plásticos de 4 l contendo substrato de casca de pinus e vermiculita (1/1), com fotoperíodo de 12h/12h a 25 °C. Apenas 4 plantas por vaso foram deixadas após a germinação e regadas com 60 ml de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950) a cada 3 dias. Após 30 dias, o tratamento inicial foi com 100 µM de GA₃; 100 µM GA₃ + 10 µM AIA e 10 µM AIA, reaplicado o mesmo tratamento após 7 dias. No 45º dia, as plantas foram coletadas para análise biométrica.

Experimento de campo

Em uma área plana contendo o cultivo de braquiária pré-existente, a gramínea foi cortada rente ao solo e, após a rebrota, foram delimitadas 18 parcelas com área total de 4m² cada. O tratamento inicial foi com 50 µM de GA₃ e 50 µM de GA₃ + 5 µM de AIA, sendo o mesmo tratamento reaplicado após 15 dias. Os tratamentos com 6 parcelas cada, foram aplicados por aspersão foliar com pulverizador costal de CO₂ com vazão de 1 L/min. No 45º dia, as plantas foram coletadas para análise biométrica.

Determinação dos parâmetros biométricos

As plantas tiveram seu crescimento medido, determinando-se a altura da parte aérea com o uso de uma fita métrica, e a biomassa fresca foi pesada e seca a 50°C e novamente pesada.

Determinação da lignina

O protocolo utilizado para quantificar a lignina foi realizado após a preparação dos tecidos para excluir proteínas e outros componentes da parede celular. Esta remoção é essencial para evitar a interferência destes compostos.

Preparação de parede celular sem proteína

As amostras secas (0,3 g) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM (7 ml, pH 7,0) usando gral e pistilo e depois transferidas para um tubo de centrífuga. A suspensão foi centrifugada (1,400 xg, 4 min), lavada por agitação sucessiva e centrifugada como se segue: oito vezes com tampão fosfato de potássio (pH 7,0; 7 ml), quatro vezes com Triton X-100 a 1% (v / v) em tampão pH 7,0 (7 ml), seis vezes com NaCl 1 M em tampão pH 7,0 (7 ml), três vezes com água destilada (7 ml) e duas vezes com acetona PA (5 ml). O pellet foi seco em estufa (60 °

C, 24 h) e arrefecido em dessecador a vácuo. A matéria seca obtida foi definida como a fração da parede celular sem proteína (Ferrarese et al., 2002).

Lignina total

As amostras de parede celular livre de proteína (20 mg) foram colocadas em tubos de centrífuga de tampa roscada contendo 0,5 ml de brometo de acetilo a 25% (v / v em ácido acético PA) e incubadas a 70 ° C por 30 min. Após a digestão completa, as amostras foram rapidamente arrefecidas em banho de gelo e então misturada com 0,9 ml de NaOH 2 M, 0,1 ml de hidroxilamina-HCl 5 M e 6 ml de ácido acético PA suficiente para solubilização completa do extrato de lignina. Após centrifugação (1.400 × g, 4 min), a absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm. Uma curva padrão foi gerada com lignina alcalina (Aldrich 37, 096-7). Os resultados expressos em mg lignina g⁻¹ de parede celular (Moreira-Vilar et al., 2014).

Determinação sacarificação enzimática

O protocolo utilizado para realizar a sacarificação enzimática foi realizado após a preparação dos tecidos para a retirada de açúcares solúveis da biomassa. A sacarificação é a determinação da glicose livre após o uso de enzimas específicas para quebrar as ligações β-1,4 da celulose.

Preparação da biomassa isenta de açúcares solúveis

Amostras secas (300 mg) em telas de nylon semipermeáveis foram colocadas no sistema de refluxo Soxhlet com etanol puro (Freitas et al., 2018), por aproximadamente 10h. Em seguida, as biomassas foram transferidas para estufa a 60 °C.

Quantificação de açúcares redutores

Em Eppendorf de 2 ml, foi adicionado 10 mg da biomassa isenta de açúcares solúveis, adicionou-se 10 µl do coquetel enzimático celulolítico (Novozymes – NS 22086) e completado para 1 ml com tampão acetato de sódio pH 5,0. Após incubação a 50 °C por 4h e 24h de reação, 100 µl do sobrenadante foram coletados em tubos de ensaio, adicionados 100 µl do reagente DNS 1%, e incubado a 100 °C por 5 min. Completado com 800 µl do tampão acetato de sódio, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Para o branco, foram utilizados 100 µl do DNS 1% e 900 µl do tampão fosfato de sódio. Os resultados foram expressos com a quantificação de glicose livre em mg g⁻¹ de biomassa (Miller, 1959).

Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). O teste Dunnett e Test t de Student foram realizados com o programa GraphPad *Prism 5.0* (San Diego, Califórnia) para verificar as significâncias das diferenças entre os parâmetros avaliados, valores de $0.05 \geq P \geq 0.01$ serão representados por "*", valores de $0.01 \geq P \geq 0.001$ serão representados por "**", e valores de $0.001 \geq P$ serão representados por "***" sendo todos considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Para verificar a eficácia da ação sinérgica entre giberelina e auxina, realizamos um experimento com plantas jovens de braquiária (*Brachiaria decumbens*) tratadas com GA₃:AIA na proporção de 10 para 1 para avaliar sua capacidade de estimular o desenvolvimento da parte aérea em vasos. Duas aplicações semanais foram realizadas durante um período de 30 dias, com os seguintes tratamentos: GA₃100 μ M; GA₃ 100 μ M + AIA 10 μ M; e AIA 10 μ M. O tratamento com giberelina mais auxina apresentou resultados significativos em todos os parâmetros biométricos, no crescimento das plantas e aumento da biomassa fresca e seca da parte aérea (Figura 1).

Tanto os tratamentos com GA₃ quanto os com GA₃ + AIA promoveram o crescimento da parte aérea da braquiária (caule e folha), com incrementos de 105,41% e 117,02%, respectivamente, em relação ao controle. O tratamento com GA₃ + AIA produziu resultados significativos em todos os parâmetros, crescimento, biomassa fresca e seca da parte aérea. A ação conjunta da giberelina com a auxina proporcionou aumento de 39,89% na biomassa fresca e 54,23% na biomassa seca.

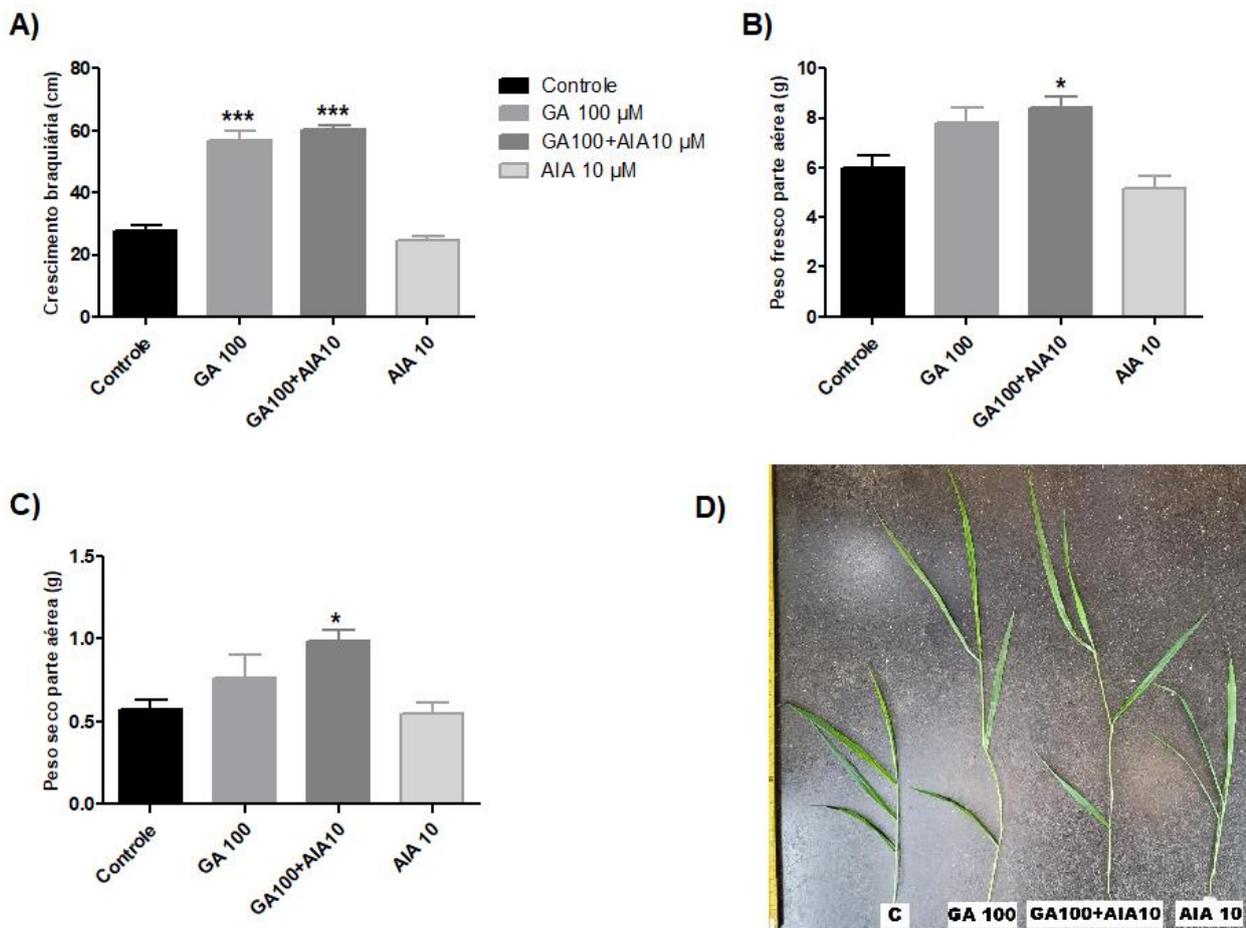


Figura 1. Crescimento e produção de biomassa em plantas de braquiária em vasos tratadas com GA₃ e AIA. A) Gráfico do crescimento médio da braquiária do controle e GA₃ nas concentrações de 100 μM de GA₃; 100 μM GA₃ + 10 μM AIA; e 10 de μM AIA, durante um período de 45 dias (cm). B e C) Gráfico de peso fresco e seco da biomassa (braquiária) do controle e dos tratamentos (g). D) Foto do controle (à esquerda) e dos tratamentos. Barras de erro indicam as médias ± EPM, n = 10. Teste de Dunnet: *0.05 ≥ P ≥ 0.01, **0.01 ≥ P ≥ 0.001, ***0.001 ≥ P.

O teor de lignina aumentou nos tratamentos com GA e GA + AIA. Na sacarificação por 4h e 24h não foi observada alteração entre o controle e esses tratamentos (Figura 2). O teor de lignina total na braquiária, com os tratamentos GA₃ e GA₃ + AIA aumentou 44,44% e 38,25%, respectivamente, em relação ao controle, com valores de 219,95 e 210,53 mg/g de lignina, nos respectivos tratamentos e 152,28 mg/g de lignina no controle. O aumento da lignina resultante dos tratamentos não apresentou correlação com a sacarificação. O tratamento AIA 10 μM foi o único que promoveu a sacarificação da braquiária (31,59%) em 24h de digestão, quando comparada ao controle (Figura 2).

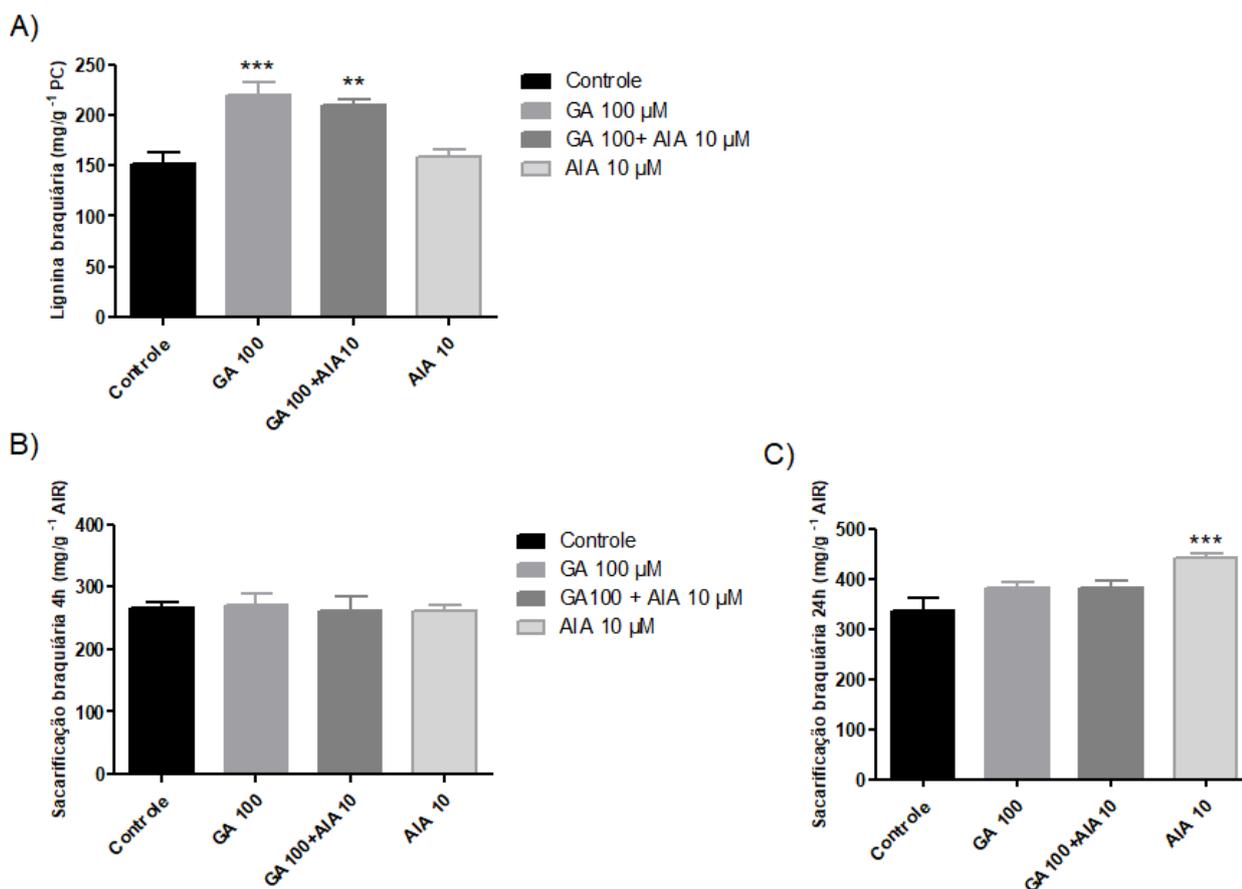


Figura 2. A) Teor total de lignina da biomassa da parte aérea da braquiária de vaso com o controle e tratamentos com GA 100 μM , GA 100 μM + AIA 10 μM e AIA 10 μM (mg/g de CW). B e C) Sacarificação da celulose em glicose 4h e 24h da biomassa de braquiária com o controle e tratamento com GA 100 μM , GA 100 μM + AIA 10 μM e AIA 10 μM (mg/g de AIR). Barras de erro indicam as médias \pm EPM, $n = 10$. Teste de Dunnet: $*0.05 \geq P \geq 0.01$, $**0.01 \geq P \geq 0.001$, $***0.001 \geq P$.

Terminado e avaliado o experimento em escala de laboratório, iniciou-se o experimento de campo com a braquiária pré-existente em uma fazenda leiteira com sistema de pastejo rotacionado, em clima mais ameno durante o período de inverno. Utilizamos a mesma proporção de 10 para 1 GA₃:AIA para avaliar melhor a capacidade dos hormônios de estimular o desenvolvimento da parte aérea da gramínea em um ambiente não controlado. Foram duas aplicações quinzenais realizadas durante um período total de 45 dias, com os seguintes tratamentos: GA₃ 50 μM e GA₃ 50 μM + AIA 50 μM . Ambos os tratamentos foram capazes de aumentar a velocidade de crescimento da braquiária, porém, com valores médios de crescimento inferiores aos resultados do experimento de laboratório. Em relação à biomassa fresca e seca, apenas o uso sinérgico de GA e AIA apresentou resultados significativos (Figura 3).

O tratamento isolado de GA e o GA associado ao AIA promoveram crescimento da parte aérea da braquiária (caule e folha), com incrementos de 61,8% e 160,92%, respectivamente, em relação ao controle. Porém, apenas GA₃ + AIA produziu resultados significativos de biomassa, com aumentos de 106,1% de biomassa fresca e 90,34% de biomassa seca, em relação ao controle (Figura 3).

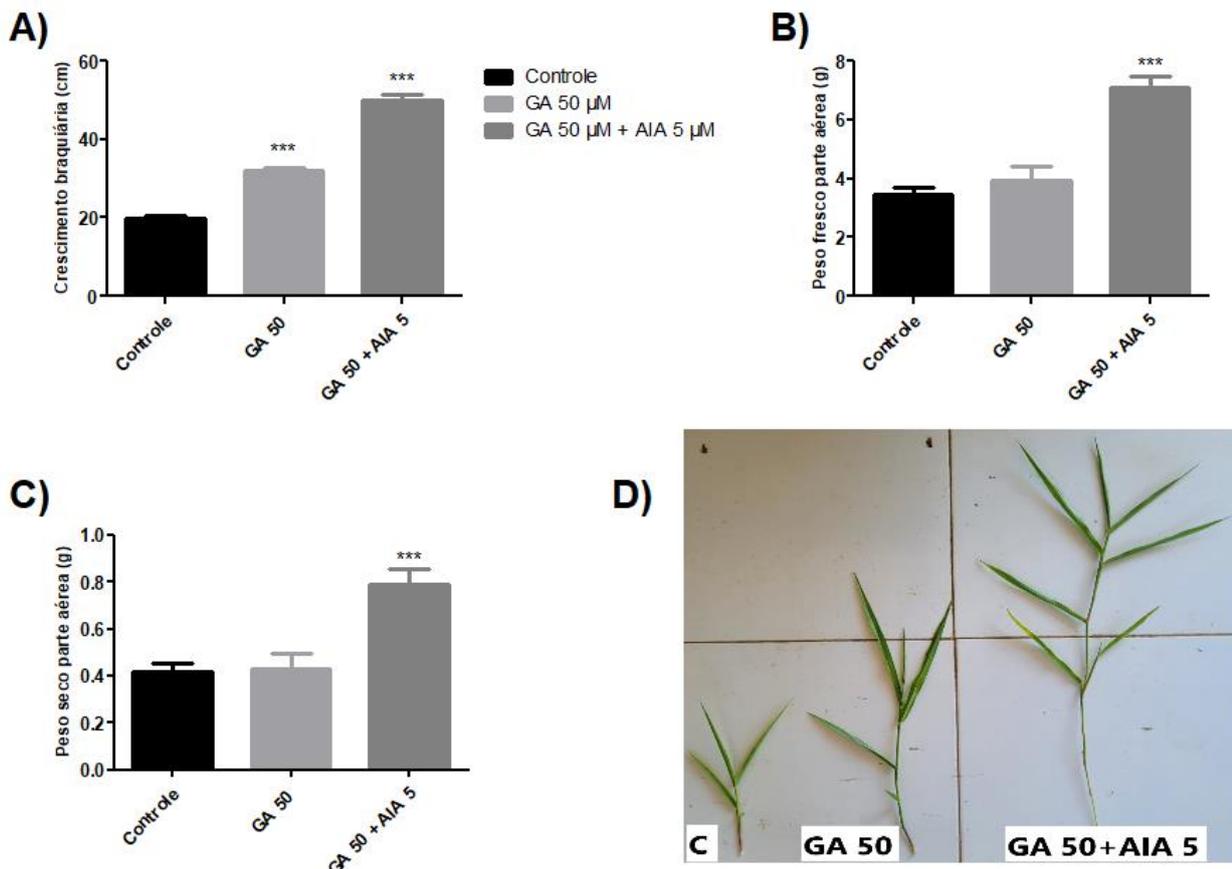


Figura 3. Crescimento e produção de biomassa em plantas de braquiária em campo tratadas com GA₃ e AIA. A) Gráfico do crescimento médio da braquiária do controle, GA₃ 50 µM, e GA₃ 100 µM + AIA 5 µM, durante um período de 45 dias (cm). B e C) Gráfico de peso fresco e seco da biomassa (braquiária) do controle e dos tratamentos (g). D) Foto do controle (à esquerda) e dos tratamentos. Barras de erro indicam as médias ± EPM, n = 6. Teste de Dunnet: *0.05 ≥ P ≥ 0.01, **0.01 ≥ P ≥ 0.001, ***0.001 ≥ P.

Ao contrário da braquiária de vaso em laboratório, que teve aumento de lignina, a braquiária de campo apresentou redução significativa no teor de lignina total em ambos os tratamentos, e na sacarificação por 4 h e 24 h, nenhuma alteração foi observada entre o controle e esses tratamentos (Figura 4). O tratamento apenas com GA₃ reduziu a lignina em 20,28%, com valor de 172,14 mg/g de lignina, em relação ao controle, que apresenta valor de 215,93 mg/g de lignina. O tratamento GA₃ + AIA reduziu a lignina em 16,71%, com valor de 179,85 mg/g de

lignina total. A redução da lignina decorrente dos tratamentos não se correlacionou com a sacarificação da braquiária, pois ambos os tratamentos não apresentaram alteração na digestão em 4 e 24 h, apesar da tendência de aumento da sacarificação em 24 h com GA₃ + AIA (Figura 4).

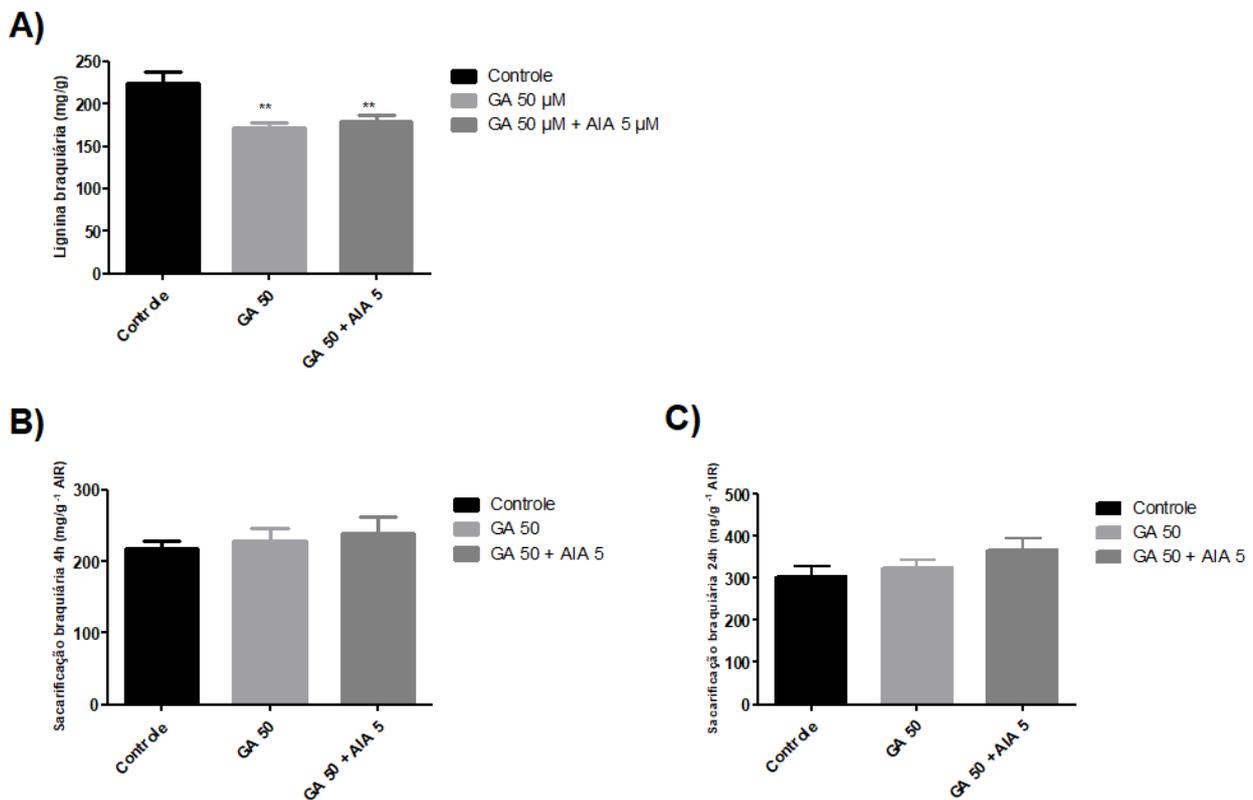


Figura 4. A) Teor total de lignina da biomassa da parte aérea da braquiária de campo com o controle e tratamentos com GA 50 μ M e GA 50 μ M + AIA 5 μ M (mg/g de CW). B e C) Sacarificação da celulose em glicose 4h e 24h da biomassa de braquiária com o controle e tratamento com GA 50 μ M e GA 50 μ M + AIA 5 μ M (mg/g de AIR). Barras de erro indicam as médias \pm EPM, $n = 6$. Teste de Dunnet: $*0.05 \geq P \geq 0.01$, $**0.01 \geq P \geq 0.001$, $***0.001 \geq P$.

Discussão

O uso de bioestimulantes, ou também denominados de reguladores de crescimento, como a giberelina e a auxina, quando aplicados separadamente ou em conjunto, mostrou ganhos significativos na produtividade da *Brachiaria decumbens*, ou seja, aumento na velocidade de crescimento e biomassa, seja para o experimento em escala de laboratório ou experimento de campo. Mas, ao comparar o teor de lignina total, a braquiária cultivada em vasos no laboratório, houve um aumento significativo da lignina presente na parede celular com os tratamentos de GA associados ou não com AIA, e na braquiária a campo, aconteceu o oposto, uma redução da lignina em ambos os tratamentos. No entanto, a sacarificação enzimática, processo de digestão da celulose para liberação de glicose livre, não foi significativamente alterada pelos tratamentos em ambos experimentos. Mesmo sabendo que o processo de digestão de um ruminante é muito diferente e complexo, quando comparado com a técnica utilizada no laboratório de digestibilidade da biomassa, podemos sugerir que tratamentos com hormônios vegetais poderiam beneficiar na alimentação de animais em pastejo, aumentando a produtividade no campo com incremento de massa verde na braquiária, sem afetar o processo de digestibilidade.

Em gramíneas, como a braquiária, as fibras formam a principal fração da biomassa, sendo formada predominantemente por carboidratos, como celulose e hemicelulose, mas também com importante contribuição da lignina (Kondo et al., 1987; Hatfield e Fukushima, 2005; Mohnen et al., 2008). Esses componentes estão organizados na parede celular da planta, e a presença de lignina e hemicelulose na matriz lignocelulósica dificulta a degradação do material e reduz a acessibilidade à celulose (Zhang et al., 2015). Na literatura, os valores de concentração de celulose, lignina e hemicelulose encontrados na *Brachiaria decumbens* são: 38,4% celulose, 10,2% lignina e 38,0% hemicelulose (Gobbi et al., 2005). Sabendo que, em porcentagem, a lignina tem uma participação menor no volume da biomassa em comparação aos carboidratos, e portanto, em baixa variação em seu teor, não poderia impactar no processo de digestão enzimática, o que poderia explicar o aumento de lignina em braquiária cultivada no laboratório ou a redução de lignina na braquiária no campo, sem interferir na análise de sacarificação (Aloni et al., 1990).

Nos modelos experimentais de laboratório ou de campo, ambos demonstraram que GAs associados ou não a AIAs, são capazes de acelerar o crescimento da braquiária e aumentar a biomassa fresca e seca, devido ao crescimento celular ser mediado por esses hormônios no afrouxamento da parede celular. O processo de expansão ocorre quando a AIA estimula a célula a secretar prótons, acidificando a região da parede celular e elevando a atividade de expansinas

(Cosgrove, 1997). Outros estudos sugerem que a GA também desempenha uma função importante no processo de expansão celular, onde o crescimento celular promovido pela GA é mediado, em parte, pela ação da *xyloglucano endotransglicosidases-hidrolase* (XETs) juntamente com expansinas que atuam no afrouxamento da parede celular, em tecidos ainda em desenvolvimento, como no caso da braquiária (Nishitani, 1997).

A utilização de bioestimulantes pode ser uma alternativa para aumentar a produtividade ou auxiliar na recuperação de pastagens, pois proporciona maior desenvolvimento na formação dos diversos órgãos vegetais, como folhas, caules e brotos, conseqüentemente, proporciona um rápido crescimento e desenvolvimento da planta como um todo. Com isso, o desempenho animal e capacidade de suporte do pasto podem ser beneficiados (Pereira et al., 2018). Assim, ambos experimentos com a braquiária revelaram um comportamento semelhante aos observados em eucalipto (Capítulo 2) quando GA₃ e AIA, aplicados exogenamente por pulverização foliar, aumentaram a velocidade de crescimento e produção de biomassa sem reduzir a sacarificação. Em um trabalho semelhante realizado com *Brachiaria brizantha*, houve semelhanças nos efeitos da ação sinérgica da GA e AIA, onde a aplicação dos reguladores de crescimento associados ao fósforo para a recuperação de pastagens pós-geada, aumentou sua produtividade, e os valores de biomassa fresca e seca (Santos et al., 2021).

Conclusão

Os bioestimulantes, podem ser uma ferramenta interessante para a formação e recuperação de pastagens com níveis iniciais de degradação. A giberelina associada à auxina proporcionou incrementos no desenvolvimento e crescimento de *Brachiaria decumbens*, podendo aumentar a produtividade da forrageira e favorecer o desempenho animal. Alterações no teor de lignina não interferiram no crescimento e na sacarificação das plantas.

Referências

- Aloni, R; Tollier, M. T.; Monties, B. The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and in xylem of *Coleus blumei* stems. *Plant Physiology*, v. 94, n. 4, p. 1743-1747, 1990.
- Borghi, E. Recuperação de pastagens degradadas. *Agricultura de baixo carbono: tecnologias e estratégias de implantação*. Brasília, DF: Embrapa, v. 4, p. 105-138, 2018.

- Campos, N. R. Características Morfogênicas e Estruturais da *Brachiaria decumbens* em Sistema Silviopastoril e Cultivo Exclusivo. Revista Brasileira de Biociências, v. 5, n. S2, p. 819-821, 2007.
- Cosgrove, D. J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular basis of extensible walls and cell enlargement. Plant Cell, Rockville, v. 9, p. 1031-1041, 1997.
- Ferrarese, M. L. L.; Zottis, A.; Ferrarese-Filho, O. Quantificação de lignina livre de proteína em raízes de soja (*Glycine max*). Biol. v. 57, p. 541-543, 2002.
- De Souza, J. P. Características morfogênicas, estruturais e agrônômicas de gramíneas tropicais: uma revisão. Research, Society and Development, v. 9, n. 8, p.98, 2020.
- Gazzoni, D. L.; Gazzoni, D. L. Tiametoxam: Uma revolução na agricultura brasileira. São Paulo: Vozes, 2008.
- Hatfield, R.; Fukushima, R. S. Can lignin be accurately measured? Crop science, v. 45, n. 3, p. 832-839, 2005.
- Hoffmann, A. Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período da seca. Nativa, v. 2, n. 2, p. 119-130, 2014.
- Hoagland, D. R. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, v. 347, n. 2nd edit, 1950.
- Gobbi, K. F.; Garcia, R.; Garcez Neto, A. F.; Pereira, O. G.; Bernardino, F. S.; Rocha, F.S. Composição química e digestibilidade in vitro do feno de *Brachiaria decumbens* Stapf. tratado com ureia. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 34, n. 3, p. 720-725, 2005.
- Kichel, A. N.; Miranda, C. H. B.; Zimmer, A. H. Degradação de pastagens e produção de bovinos de corte com a integração agricultura x pecuária. Simpósio de produção de gado de Corte, v. 1, p. 201-234, 1999.
- Kondo, T.; Mizuno, K.; Kato, T. Some characteristics of forage plant lignin. Japan Agricultural Research Quarterly, v. 21, n. 1, p. 47-52, 1987.
- Miller, G. L. Modified DNS method for reducing sugars. Anal Chem, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

- Mohnen, D.; Bar-Peled, M.; Somerville, C. Cell wall polysaccharide synthesis. In: HIMMEL, M. (Ed.). *Biomass Recalcitrance: Deconstructing Plant Cell Wall Bioenergy*. Oxford: Blackwell, p. 94–187, 2008.
- Moreira-Vilar, F. C.; Siqueira-Soares, R. D. C.; Finger-Teixeira, A.; Oliveira, D. M. D.; Ferro, A. P.; Da Rocha, G. J. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods. *PLoS ONE*, v. 9, p. 10, 2014.
- Nishitani, K. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *International review of cytology*, v. 173, p. 157-206, 1997.
- Oliveira, E. R. Tecnologia e degradação de pastagens na pecuária no Cerrado brasileiro. *Sociedade & Natureza*, v. 32, p. 585-596, 2022.
- Pereira, K. A. Parâmetros anatômicos, morfológicos e fisiológicos de forrageiras cultivadas em sistema agrossilvipastoril: uma revisão. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 11, n. 4, p. 1333-1355, 2018.
- Santos, C. Y. L. Avaliação do desenvolvimento de pastagem pós geada com aplicação de fósforo e estimuladores de crescimento (auxina e giberelina). Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) - Faculdade de Ensino Superior do Centro do Paraná, Pitanga- PR, 2022.
- Santos, M. E. R. Características estruturais e índice de tombamento de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk em pastagens diferidas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 626-634, 2009.
- Seiffert, N. F. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. EMBRAPA-CNPQC, Campo Grande - MS, 1980.
- Silva, T. C. Morfogênese e estrutura de *Brachiaria decumbens* em resposta ao corte e adubação nitrogenada. *Archivos de zootecnia*, v. 61, n. 233, p. 91-102, 2012.
- Vieira, E. L.; Castro, P. RC. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 23, n. 2, p. 222-228, 2001.
- Zhang, L.; Tsuzuki, T.; Wang, X. Preparation of cellulose nanofiber from softwood pulp by ball milling. *Cellulose*, v. 22, p. 1729-1741, 2015.