

RESPOSTAS HORMONAIS E ANTIOXIDANTES NA INDUÇÃO DO
ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS JUVENIS DE *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb.
ex Steud. TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDO
INDOLBUTÍRICO

MARIA CLARA COUTINHO RODRIGUES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO–2025

RESPOSTAS HORMONAIS E ANTIOXIDANTES NA INDUÇÃO DO
ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS JUVENIS DE *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb.
ex Steud. TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDO
INDOLBUTÍRICO

MARIA CLARA COUTINHO RODRIGUES

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutora em Produção
Vegetal”

Orientadora: profa. Deborah Guerra Barroso

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO – 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R696

Rodrigues, Maria Clara Coutinho.

Respostas hormonais e antioxidantes na indução do enraizamento de miniestacas juvenis de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steud. tratadas com peróxido de hidrogênio e ácido indolbutírico / Maria Clara Coutinho Rodrigues. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

94 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2025.

Orientadora: Deborah Guerra Barroso.

1. Louro pardo. 2. propagação vegetativa. 3. regulação hormonal. 4. sistema antioxidante. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

RESPOSTAS HORMONAIS E ANTIOXIDANTES NA INDUÇÃO DO
ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS JUVENIS DE *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb.
ex Steud. TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDO
INDOLBUTÍRICO

MARIA CLARA COUTINHO RODRIGUES

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal”

Aprovada em 17 de julho de 2025

Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente

ELZIMAR DE OLIVEIRA GONÇALVES

Data: 08/10/2025 15:39:56-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Elzimar de Oliveira Gonçalves (D.Sc., Ciência Florestal) – UFES



Documento assinado digitalmente

GIOVANNA CAMPOS MAMEDE WEISS DE CARVALHO

Data: 08/10/2025 11:24:35-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Giovanna Campos Mamede Weiss de Carvalho (D.Sc., Produção Vegetal) –
UENF



Documento assinado digitalmente

JURANDI GONÇALVES DE OLIVEIRA

Data: 08/10/2025 15:09:57-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (D. Sc., Biologia Vegetal) – UENF



Documento assinado digitalmente

DEBORAH GUERRA BARROSO

Data: 08/10/2025 08:36:40-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Deborah Guerra Barroso (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF
(Orientadora)

“A verdade da semente é a árvore”

Ditado popular

Ao meu filho Rafael,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, princípio e fim de todas as coisas;

Ao meu filho Rafael, que se sacrificou comigo para que esse curso fosse concluído;

Aos meus pais e irmão, Ana Claudia, Dilson e Hugo, pelos anos de educação, apoio e incentivo, sempre me lembrando que, para uma família preta, um doutorado é uma ruptura de estigma e uma conquista conjunta;

Aos meus familiares, em especial à Rita, ao Alberto e à Maria José, que junto aos meus pais ofereceram apoio para as minhas idas a Campos dos Goytacazes;

Aos meus colegas de laboratório e amigos Giovanna, Ana Carolina, Isabelle, Jussara, Christian, David e Guilherme pela amizade e por todo o apoio prestado durante a execução dos experimentos;

Aos professores Deborah Guerra Barroso, Jurandi Gonçalves de Oliveira e Claudete Santa Catarina pela orientação, incentivo e suporte na execução dos trabalhos;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Fitotecnia pela oportunidade de realização do curso;

À banca de defesa pela disponibilidade e sugestões;

Aos servidores da UENF;

A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma para a conclusão desta etapa;

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO GERAL	3
Objetivos específicos	3
REVISÃO DE LITERATURA	4
Louro-pardo	4
Propagação Vegetativa via miniestaquia	6
Enzimas antioxidantes e seu papel no enraizamento adventício	7
Fitohormônios e seu papel no enraizamento adventício	9
MATERIAL E MÉTODOS	12
Formação das minicepas	12
Experimento 1: Miniestaquia de dois materiais de origem seminal e diferentes graus de maturação de <i>C. trichotoma</i>	13
Coleta e preparo das miniestacas	13
Delineamento experimental	13
Análises biométricas	14
Análise de dados	16
Experimento 2: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes em materiais de diferentes graus de maturação de <i>C. trichotoma</i>	17
Coleta e preparo das miniestacas	17
Delineamento experimental	17
Análises hormonais	18
Análises enzimáticas	18
Análise de dados	19
Experimento 3: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes sob efeito de tratamentos de enraizamento em miniestacas de <i>C. trichotoma</i>	20
Coleta e preparo das miniestacas	20
Delineamento experimental	20
Análises biométricas	21
Análises enzimáticas e hormonais	21

Análise de dados.....	22
RESULTADOS	24
Experimento 1: Miniestaquia de dois materiais de origem seminal e diferentes graus de maturação de <i>C. trichotoma</i>	24
Experimento 2: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes em materiais de diferentes graus de maturação de <i>C. trichotoma</i>	31
Experimento 3: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes sob efeito de tratamentos de enraizamento	40
DISCUSSÃO	51
Experimento 1: Miniestaquia de dois materiais de origem seminal e diferentes graus de maturação de <i>C. trichotoma</i>	51
Experimento 2: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes em materiais de diferentes graus de maturação de <i>C. trichotoma</i>	54
Experimento 3: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes sob efeito de tratamentos de enraizamento.....	58
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICE: Análises de variância e testes de média	75

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Altura
ABA – Ácido abscísico
ACC – Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (precursor do etileno)
AIA – Ácido indolacético
AIB – Ácido indolbutírico
AJ – Ácido jasmônico
ANOVA – Análise de variância
APX – Ascorbato peroxidase
AsA – Ácido ascórbico
AS – Ácido salicílico
CAT – Catalase
CTRPO – Comprimento total de raízes de primeira ordem
DAC – Diâmetro do colo
DHAR – Dehidroascorbato redutase
GR – Glutathione redutase
GSH – Glutathione reduzida
GSSG – Glutathione oxidada
H₂O – Água
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IQD – Índice de Qualidade de Dickson
MDHAR – Monodehidroascorbato redutase
MSPA – Massa seca da parte aérea
MSSR – Massa seca do sistema radicular
NRPO – Número de raízes de primeira ordem
O₂⁻ – Superóxido
PCA – Análise de componentes principais
POD – Peroxidase
SCV – Sobrevivência na casa de vegetação
SE – Sobrevivência na expedição da câmara de nebulização
SOD – Superóxido dismutase
ST – Sobrevivência total

RESUMO

RODRIGUES, Maria Clara Coutinho; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; julho de 2025; Respostas hormonais e antioxidantes na indução do enraizamento adventício de miniestacas juvenis de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. tratadas com peróxido de hidrogênio e ácido indolbutírico; Orientadora: D.Sc. Deborah Guerra Barroso.

Cordia trichotoma (Vell.) Arráb. ex Steud., conhecida como louro-pardo, é uma espécie florestal nativa de interesse econômico e ecológico. Sua propagação por miniestaquia para material com menos de um ano de idade é conhecida, mas limitada pelo longo tempo de tratamento de enraizamento (20 horas) e baixa responsividade em materiais mais maduros. Este estudo teve como objetivo avaliar na primeira etapa o efeito da combinação entre peróxido de hidrogênio (H_2O_2 : 0 e 50 mmol.L⁻¹) e ácido indolbutírico (AIB: 0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg L⁻¹) sobre o enraizamento adventício de miniestacas oriundas de minicepas com dois e cinco anos de idade, utilizando tempo reduzido de tratamento. Na segunda etapa, investigou-se a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e glutathione redutase (GR), além dos hormônios ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS) e do precursor etilênico ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), em materiais de diferentes idades e origens tratados ou não com indutores de enraizamento. Os resultados demonstraram que o envelhecimento da idade dos materiais reduziu a sobrevivência das miniestacas, sendo o tratamento com AIB a 4000 mg L⁻¹ mais eficaz na indução do enraizamento no material de dois anos de idade. Não houve efeito de H_2O_2 isolado para as características avaliadas, mas sua associação com 300 mg L⁻¹ de AIB aumentou o comprimento de raízes de primeira ordem em miniestacas oriundas de minicepas com dois anos de idade. Na quantificação de enzimas e hormônios, o tratamento com H_2O_2 + AIB elevou os níveis de AS, ABA, AIA e AIB, enquanto o controle apresentou maior acúmulo de AJ, CAT e POD. As análises multivariadas revelaram padrões fisiológicos integrados, não detectados por análises univariadas. Conclui-se que o protocolo com H_2O_2 + AIB pode servir como base para a miniestaquia de *C. trichotoma*, desde que ajustado ao tipo de material.

Palavras-chave: Louro pardo; propagação vegetativa; regulação hormonal; sistema antioxidante.

ABSTRACT

RODRIGUES, Maria Clara Coutinho; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense; July 2025. Hormonal and antioxidant responses during the induction of adventitious rooting in juvenile mini-cuttings of *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. treated with hydrogen peroxide and indole-3-butyric acid; Advisor: D.Sc. Deborah Guerra Barroso.

Cordia trichotoma (Vell.) Arráb. ex Steud., known as louro-pardo, is a native forest species of economic and ecological interest. Its propagation by mini-cuttings for material less than one year old is known, but limited by the long rooting treatment time (20 hours) and low responsiveness in more mature materials. This study aimed, in the first stage, to evaluate the effect of the combination between hydrogen peroxide (H_2O_2 : 0 and 50 mmol.L⁻¹) and indole-3-butyric acid (IBA: 0, 2000, 4000, 6000 and 8000 mg L⁻¹) on adventitious rooting of mini-cuttings from two- and five-year-old stock plants, using a reduced treatment time. In the second stage, the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and glutathione reductase (GR) was investigated, along with the hormones indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), and the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), in materials of different ages and origins, treated or not with rooting inducers. Results showed the aging reduced the survival of mini-cuttings, with treatment with IBA at 4000 mg L⁻¹ being the most effective in inducing rooting in two-year-old material. No isolated effect of H_2O_2 was observed for the evaluated traits, but its association with 300 mg L⁻¹ IBA increased the length of first-order roots in mini-cuttings from two-year-old stock plants. In the quantification of enzymes and hormones, treatment with H_2O_2 + IBA raised the levels of SA, ABA, IAA and IBA, whereas the control showed higher accumulation of JA, and activity of CAT and POD. Multivariate analyses revealed integrated physiological patterns not detected by univariate analyses. It is concluded that the H_2O_2 + IBA protocol can serve as a basis for the mini-cutting propagation of *C. trichotoma*, provided it is adjusted to the type of material.

Keywords: *Cordia trichotoma*; vegetative propagation; hormonal regulation; antioxidant system.

INTRODUÇÃO

A espécie *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud., conhecida como louro-pardo, é considerada prioritária para a silvicultura econômica (Rolim et al., 2020), além de ser fundamental em trabalhos de restauração. Destaca-se pelo rápido crescimento, qualidade da madeira e potencial paisagístico (Kielse et al., 2013; Wille et al., 2017), entretanto, apresenta alta variabilidade genética e fenotípica (Santos et al., 2021). Como consequência, obtêm-se plantios não homogêneos (Radomski et al., 2012; Santos, 2018).

A propagação vegetativa surge como alternativa para a clonagem de genótipos superiores, mas os protocolos disponíveis ainda apresentam restrições, especialmente em materiais fisiologicamente maduros. Há mais de 15 anos, estudos com diferentes técnicas de propagação vegetativa de *C. trichotoma* vêm sendo conduzidos. Experimentos iniciais com micro e miniestaquia resultaram em taxas satisfatórias de sobrevivência, mas o enraizamento era extremamente limitado, mesmo com a aplicação de auxinas (Fick, 2007).

Avanços posteriores indicaram que estacas radiculares de plantas juvenis com cerca de três anos podem atingir até 45% de enraizamento com AIB (Kielse et al., 2013). Miniestacas clonais, oriundas de plantas jovens, também apresentaram melhor desempenho rizogênico em relação às seminais, independentemente do uso de reguladores (Kielse et al., 2015). Já em estacas semilenhosas, o aumento da concentração de AIB elevou o enraizamento em até 28,9%, mas comprometeu a emissão de brotações e aumentou a mortalidade (Fick, 2007; Faganello et al., 2015).

Além disso, os entraves associados à maturação do material vegetativo foram evidenciados. Estacas de raízes e ramos de plantas adultas mostraram-se incapazes de formar raízes, embora fossem capazes de emitir brotações. Em contraste, estacas de raízes de plantas jovens apresentaram enraizamento mesmo sem aplicação de AIB, reforçando a importância da juvenilidade na resposta rizogênica (Bisognin et al., 2020).

Considerando os avanços e limitações na propagação vegetativa de *C. trichotoma*, foi desenvolvido um protocolo baseado na imersão da base das miniestacas em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), seguida da aplicação de AIB, em um tratamento com duração total de 20 horas. Esse método se mostrou altamente eficiente em materiais juvenis

com menos de um ano de idade, alcançando até 90% de enraizamento (Silva et al., 2022). No entanto, ao estender o protocolo para miniestacas provenientes do resgate vegetativo de árvores adultas, não foi observado enraizamento. Esses resultados motivaram a condução dos experimentos que serão apresentados a seguir, com foco na redução do tempo de exposição ao tratamento e na investigação dos fatores fisiológicos associados à perda da competência rizogênica.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de combinações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido indol butírico (AIB) sobre o enraizamento de miniestacas obtidas de minicepas de *Cordia trichotoma*, com diferentes graus de juvenilidade e descrever as alterações enzimáticas e hormonais causadas pelos tratamentos.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito da combinação de AIB em diferentes concentrações, associada à pré-imersão em H_2O_2 de miniestacas obtidas em minicepas de diferentes idades e origens;
- ✓ Determinar a atividade das enzimas ascorbato peroxidase, catalase, monodehidroascorbato redutase, dehidroascorbato redutase, glutatona redutase, peroxidase e superóxido desmutase em miniestacas obtidas em minicepas de diferentes idades e origens;
- ✓ Quantificar os fitohormônios ácido abscísico, ácido indolacético, ácido indolbutírico, ácido jasmônico, ácido salicílico e o precursor do etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, em miniestacas obtidas em minicepas de diferentes idades e origens.

REVISÃO DE LITERATURA

Louro-pardo

Pertencente à família Cordiaceae, *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud, o louro-pardo é uma das 400 espécies que estão distribuídas nos dois gêneros dessa família (*Cordia* e *Varronia*), que estão mundialmente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais (Reflora, 2025). Apesar de muitas fontes ainda classificarem louro-pardo como membro da família Boraginaceae, em razão das características únicas como cotilédones plicados e estilete duas vezes dicotômico, com quatro ramos estigmáticos encontradas no gênero *Cordia*, garantiram a classificação de uma nova família (Hilger e Zippel, 2001, Luebert et al., 2016). Além disso, semelhanças genéticas foram encontradas no gênero *Varronia*, indicando parentesco com o gênero *Cordia* (Miller e Gottschling, 2007) e garantindo classificação dentro da família Cordiaceae, nomenclatura atualmente aceita.

Trata-se de uma árvore caducifólia, de tronco reto, com fuste bem definido, apresentando madeira de ótima qualidade (Carvalho, 2003a). O incremento médio anual varia de 5 a 23 m³ ha⁻¹ano⁻¹ em solos de fertilidade média ou alta (Carvalho, 2003b), com possibilidade de primeira coleta aos 15 anos de cultivo. Na Mata Atlântica, observou-se ampla variabilidade no crescimento da espécie, com diâmetro à altura do peito oscilando de 3 a 28 cm e altura estimada de 3,2 a 17,8 m aos 21 anos de cultivo (Barroso et al., 2018b).

Suas folhas são simples, dispostas de forma alternada e espiraladas no eixo do ramo, subcoriáceas, ásperas e com ápice acuminado. Apresentam variação quanto ao tamanho, tonalidade e grau de pilosidade, podendo ser muito ou pouco pilosas ou totalmente lisas (Freitas et al., 2006). Seu pecíolo é cilíndrico, delgado e de coloração esbranquiçada (Lopes, 2011). Sua inflorescência é constituída por pequenas flores esbranquiçadas, cismoso-paniculada e disposta de forma terminal nos ramos. As flores possuem cálice gamossépalo esverdeado, assimétrico, são perfumadas, e de ocorrência natural de janeiro a julho (Carvalho, 2003a; Felippi et al., 2012).

C. trichotoma está naturalmente distribuído na Argentina e no Paraguai. No Brasil, ocorre nos estados Bahia, Ceará, Paraíba, Sergipe, Pernambuco, Piauí, Goiás,

Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Scheeren et al., 2002; Carvalho, 2003b, Pinã-Rodrigues et al., 2021). Ecologicamente, é descrita como espécie secundária com tendência a pioneirismo. Em sucessão, sua presença é comum como vegetação secundária no estágio de capoeira e capoeirões (Scheeren et al., 2002; Carvalho, 2003a; Carvalho, 2003b). Em razão dessas características, pode ser utilizada em projetos ligados ao paisagismo, reflorestamento com destaque à reserva legal, recuperação de áreas degradadas e sistemas agroflorestais (Carvalho, 2003a; Felippi et al., 2012; Faganello et al., 2015).

Sua madeira possui cerne com coloração pardo claro amarelada, com boa usinabilidade, facilitando o processo de laminação e sendo empregada na confecção de revestimentos decorativos, persianas, construção de pequenas embarcações e movelaria de luxo (Trianoski e Iwakiri, 2018). Além disso, apresenta resistência ao ataque de cupim subterrâneo (*Nasutitermes corniger* Motsch.) e possui compostos como α -cadinol com atividades antifúngicas e antideteriorativas (Paes et al., 2007; Wille et al., 2017), aumentando o interesse comercial por sua madeira.

Trata-se de uma espécie promissora e já com existência de plantios comerciais em Araraquara-SP, Concordia-SC, Linhares-ES e Foz do Iguaçu-PR (Carvalho, 2002). Radomski et al. (2012) trabalhando com plantio de *C. trichotoma* em linhas inseridas em sistema silvipastoril, obtiveram, aos 10 anos de cultivo, árvores com diâmetro médio de 18,2 cm, altura média 9,6 m e incremento anual médio em diâmetro de 1,82 cm. Esses autores ressaltaram ainda que a espécie possui alta capacidade de rebrotar a partir das cepas e formar brotações nas raízes superficiais. Esse fato indica que é uma espécie com viabilidade de clonagem a partir de genótipos superiores.

Santos et al. (2021) estudando a interação genótipo x ambiente em progênies de *C. trichotoma*, obtiveram diâmetro médio de 12,8 cm e observaram uma variação de 4 a 26 cm, indicando a heterogeneidade dos plantios e reforçando a necessidade de seleção e multiplicação de materiais superiores para a implantação de plantios uniformes.

A respeito de seleção de indivíduos superiores de *C. trichotoma*, Nunes et al. (2024), avaliando a seleção precoce em um teste de progênie da espécie, concluíram que para cada 10 progênies selecionadas aos 3 anos, 7 permaneceram entre as melhores classificadas aos 8 anos. Nesse mesmo ensaio, os autores observaram, em

média, incremento volumétrico de $18 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Os genótipos mais produtivos, aqueles que podem ser precocemente selecionados para propagação vegetativa, apresentaram volumes superiores a $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$.

Propagação Vegetativa via miniestaquia

A propagação vegetativa resulta em indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz, através de técnicas específicas que propiciem o enraizamento adventício (Hartmann et al., 2011). No setor florestal, a obtenção de indivíduos clonais atende a diversos interesses, desde a formação de povoamentos homogêneos e altamente produtivos até a conservação de indivíduos ameaçados, em plantios de restauração, bancos de germoplasma e pomares clonais de sementes. Uma das principais técnicas utilizadas na silvicultura clonal é a miniestaquia (Xavier et al., 2009), testada com sucesso para várias espécies florestais nativas (Carvalho et al., 2021; De Deus et al., 2021; Silva et al., 2022).

Desenvolvida na década de 90 para espécies do gênero *Eucalyptus*, a miniestaquia consiste na utilização de propágulos denominados miniestacas, oriundos de plantas crescidas sob condições de viveiro. Tais plantas são denominadas minicepas e o conjunto delas forma o minijardim clonal (Xavier et al., 2009). As minicepas podem ser obtidas através de propagação sexuada ou assexuada e, conforme a espécie, a coleta periódica de brotações estimula a produção constante de miniestacas.

Silva et al. (2022) trabalhando no enraizamento de material obtido de minijardim multiclonal e tratado com combinações de AIB e H_2O_2 , relataram que a imersão da base de miniestacas de louro pardo por 8 horas em 50 mmol L^{-1} de H_2O_2 , seguidas de 300 mg L^{-1} de AIB, por 12 horas, foi capaz de aumentar expressivamente o enraizamento da espécie. As miniestacas utilizadas por Silva et al. (2022) foram obtidas de minicepas com aproximadamente 1 ano de idade. Além disso, esses autores observaram que apenas H_2O_2 não exerceu aumento significativo sobre o enraizamento da espécie e relataram que, independente dessa substância, a utilização de AIB favoreceu a qualidade do sistema radicular. Contudo, na propagação a partir de brotações induzidas em galhos adultos, a aplicação de 1500 mg L^{-1} de AIB

resultou em apenas 10% de enraizamento (Silva et al., 2021), evidenciando as dificuldades impostas pela maturação do material.

Outros métodos de propagação como estaquia de brotações de plantas adultas, estaquia de raízes de plantas adultas e estaquia de raízes de plantas jovens (Bisognin et al., 2020), com a utilização de AIB também foram testados sem sucesso para a espécie.

Desta forma, o entendimento dos efeitos fisiológicos da interação H_2O_2 x AIB pode viabilizar o resgate clonal de genótipos superiores, superando as limitações impostas pela maturação ontogenética e ampliando as possibilidades de aplicação da silvicultura clonal em outras espécies nativas.

Enzimas antioxidantes e seu papel no enraizamento adventício

Durante a indução, estágio inicial do enraizamento adventício, a miniestaca entra em um estado de intensa atividade metabólica, caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 (Steffens e Rasmussen, 2016; Zhang et al., 2017). Inicialmente entendido como componente tóxico ao metabolismo celular, níveis moderados de H_2O_2 podem atuar como sinalizadores moleculares, ativando rotas de reprogramação celular associadas à rizogênese (Neill et al., 2002).

Para que esse processo ocorra com sucesso, é necessário um delicado equilíbrio entre a produção e a remoção de H_2O_2 , seja ele produzido ou adicionado nas etapas de enraizamento. Esse procedimento pode ser garantido por enzimas antioxidantes que metabolizam H_2O_2 . Nesse contexto, enzimas como catalase (CAT), peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), monodeidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e glutathione redutase (GR) assumem papel central na manutenção da homeostase, consequentemente, na competência rizogênica dos tecidos vegetais.

A CAT, enzima presente em quase todos os organismos vivos, tem como função a decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Sua atuação é independente de cofatores redutores, ou seja, moléculas que doam elétrons durante as reações de oxirredução. Essa evidência a torna crítica na fase inicial da rizogênese, logo após o corte da miniestaca (Zhang et al., 2001). Li et al. (2009), estudando o papel de H_2O_2

na formação de raízes adventícias em *Vigna radiata*, observaram que a aplicação exógena de CAT reduziu drasticamente a formação de raízes adventícias, confirmando que H_2O_2 é um mediador essencial desse processo.

A POX tem ampla distribuição em células vegetais e participa tanto da eliminação de H_2O_2 quanto da lignificação e diferenciação celular. Sua atividade aumenta sob estresse químico, físico ou biótico, podendo atuar como marcador de estresse celular (Pisa et al., 2003; Soares et al., 2009). Em espécies como *Cinnamomum kanehirae*, observou-se redução da atividade da peroxidase em estacas tratadas com 2 g L^{-1} de AIB, indicando que sua inibição pode favorecer a plasticidade celular necessária à formação de primórdios radiculares (Cho et al., 2011).

A SOD também atua na desintoxicação das células, dismutando O_2^- em H_2O_2 (Alscher et al., 2002). Essa enzima está presente no citossol, mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, e é classificada de acordo com seus cofatores metálicos (Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD), os quais influenciam sua localização e atividade específica. Sua expressão pode variar conforme o estado nutricional e o grau de juvenildade do tecido (Bhattacharjee, 2012; Gill e Tuteja, 2010), sendo mais pronunciada em tecidos jovens com alta atividade meristemática. Liu et al. (2022) estudando o efeito do estresse salino no enraizamento adventício de *Cucumis sativus*, observaram que o estresse salino reduziu a formação de raízes, aumentou a atividade de SOD e reduziu o teor de H_2O_2 . Esses autores destacam que o desenvolvimento de raízes adventícias nas condições avaliadas se deu por meio do aumento da atividade da SOD nos propágulos.

As enzimas do ciclo ascorbato-glutationa são essenciais para o controle fino do H_2O_2 intracelular. A APX utiliza o ácido ascórbico (AsA) como substrato para reduzir H_2O_2 a água, desencadeando ciclo regenerativo onde o AsA consumido por APX é restaurado pelas enzimas MDHAR e DHAR. No fechamento do ciclo iniciado pela APX, está a enzima GR, atuando na regeneração da glutathiona reduzida (GSH) a partir de sua forma oxidada (GSSG). A GSH, por sua vez, atua como doador de elétrons durante a atividade de DHAR, tendo como produtos AsA e GSSG (Matos, 2021), completando assim o ciclo redox fundamental à homeostase celular durante a rizogênese conforme ilustrado na Figura 1.

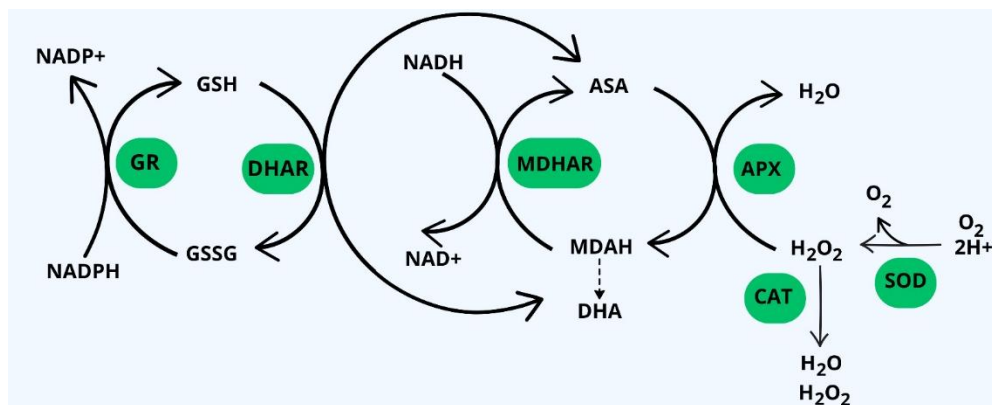


Figura 1. Esquema ilustrativo das principais enzimas envolvidas no metabolismo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), destacando o ciclo ascorbato–glutationa. As setas pretas contínuas representam o fluxo de elétrons ao longo das reações de oxirredução, enquanto a seta tracejada indica uma rota alternativa de transformação. Os produtos principais do processo são a regeneração de antioxidantes como ascorbato (ASA) e glutathione reduzida (GSH), bem como a conversão de H_2O_2 em água (H_2O). Já os subprodutos incluem espécies reativas de oxigênio (O_2^- e H_2O_2) formadas durante o metabolismo. Adaptado de Matos (2021).

No contexto da propagação clonal de *Cordia trichotoma*, o monitoramento das alterações enzimáticas antioxidantes nas miniestacas pode fornecer respostas fundamentais sobre os efeitos combinados da aplicação exógena de AIB e H_2O_2 .

Fitohormônios e seu papel no enraizamento adventício

O enraizamento adventício é um processo regulado por interações hormonais complexas e dinâmicas, nas quais auxinas e outros fitohormônios atuam de maneira fase-específica e, muitas vezes, interdependente. Os efeitos desses fitohormônios podem variar conforme a espécie, o tipo de tecido e o estágio fisiológico. Por conseguinte, podem ser mimetizados via uso de reguladores de crescimento (Druege et al., 2016; Steffens e Rasmussen, 2016).

Estudos clássicos da década de 30 identificaram o ácido indolacético (AIA) como o principal composto com efeito estimulador sobre a formação de raízes em segmentos caulinares, que ocorrem naturalmente nos vegetais. Tal substância é majoritariamente produzida em tecidos meristemáticos e transportada de forma polarizada em direção à base das estacas. Na mesma época, outras substâncias auxínicas foram sintetizadas e utilizadas de forma mais eficiente no enraizamento adventício. Uma delas é o ácido indolbutírico (AIB), que pode ocorrer naturalmente em plantas, embora de forma menos abundante que AIA (Bartel et al., 2001; Hartmann et al., 2011). As auxinas sintéticas, principalmente na forma de AIB, são os estimuladores exógenos mais eficazes no enraizamento de propágulos de diferentes espécies (Gutierrez et al., 2012; Pacurar et al., 2014). No entanto, muitas espécies florestais não respondem positivamente a estes estímulos nas concentrações testadas (Pessanha et al., 2018; Bisognin et al., 2020). No processo de regeneração vegetativa de *Cinnamomum parthenoxylon*, uma espécie arbórea asiática, foi observado um aumento rápido nos níveis de AIA e AIB durante as fases iniciais do enraizamento, seguido por uma queda acentuada, sugerindo que a formação radicular requer um ajuste fino na disponibilidade dessas auxinas ao longo das diferentes fases do processo (Luo et al., 2024).

O etileno, hormônio gasoso produzido a partir do aminoácido precursor ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), tem sua síntese estimulada por ferimentos, senescência e estresse oxidativo (Taiz et al., 2017). Após o corte do propágulo, sua produção se intensifica na base de miniestacas, onde também estão sendo estimuladas respostas de defesa à geração de espécies reativas de oxigênio, como o H_2O_2 (Steffens e Rasmussen, 2016). Em níveis moderados, o etileno atua positivamente na formação de raízes adventícias ao promover a desdiferenciação celular e a reprogramação genética necessária à formação dos primórdios radiculares, especialmente sob hipoxia. Contudo, em concentrações elevadas, exerce efeito inibitório sobre o alongamento das raízes e ativa rotas associadas à lignificação e defesa celular (Druege et al., 2016). Essa dualidade é reforçada pelos achados de Villacorta-Martín et al. (2015) que, ao estudarem o enraizamento adventício em *Dianthus caryophyllus*, observaram níveis mais elevados de ACC em uma cultivar com baixa capacidade de enraizamento. Os autores sugerem que esse acúmulo decorre da baixa conversão de ACC em etileno, enquanto a cultivar com alta competência rizogênica apresentou menor acúmulo de ACC, sugerindo maior eficiência na

produção de etileno. Ainda, o etileno influencia a atividade da enzima SOD, que converte o radical superóxido (O_2^-) em H_2O_2 , estabelecendo uma ligação entre a sinalização hormonal e o sistema antioxidante celular (Bhattacharjee, 2012).

Outro hormônio que pode modular o enraizamento é o AJ. Ele é sintetizado principalmente nas folhas, após estímulos como ferimentos, ataque de patógenos, cortes e estresses abióticos. Lischweski et al. (2015), ao estudarem o papel de AJ no enraizamento de petúnia, descobriram que 10 μM reduziu significativamente a formação radicular, enquanto 100 μM inibiu completamente o enraizamento. Essa visão é reforçada por Gutierrez et al. (2012), que descobriram que a aplicação exógena de 0,001 μM reduziu em 50% o número médio de raízes de *Arabidopsis thaliana*. Já Lee et al. (2024), que demonstraram que o AJ induz a expressão de fatores que, por fim, vão ativar a biossíntese local de AIA em explantes de *Arabidopsis*. Esses trabalhos reforçam que a sinalização e participação de AJ no enraizamento adventício é complexa e precisa ser mais bem compreendida.

Ainda revisando a fisiologia hormonal do estresse, tem-se o ABA, que é sintetizado principalmente nas folhas e raízes, e tem sua produção fortemente induzida por seca, salinidade, frio e ferimentos (Steffens, 2014; Steffens e Rasmussen, 2016). Um estudo realizado em plantas de arroz deficientes na biossíntese ou sinalização de ABA, demonstrou que quando as plantas não conseguem produzir esse hormônio adequadamente, o etileno perde seu efeito inibitório (Ma et al., 2014), podendo desencadear uma cascata bioquímica que interfere no enraizamento adventício, uma vez que etileno tem efeito ambíguo sobre o mesmo.

O AS é produzido principalmente nas folhas, a partir do aminoácido fenilalanina, e sua síntese é estimulada pelo ataque de patógenos, estresse oxidativo e lesões mecânicas, interagindo com etileno e AJ integrando uma rede de defesa vegetal (Hartmann et al., 2011). Gutierrez et al. (2012) também demonstraram que a exposição à luz aumentou o conteúdo de AS livre em plantas de *Arabidopsis* inicialmente cultivadas no escuro. Ademais, AS pode influenciar a atividade das enzimas CAT, POX, SOD, GR e reduzir níveis de H_2O_2 em situações de estresse biótico (Hayat et al., 2010).

Diante do revisado nesta seção, pode-se concluir que existe uma sinalização hormonal complexa que desencadeia o enraizamento adventício, na qual diferentes hormônios atuam de maneira integrada e fase-dependente.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação localizada em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (21°45' S, 41°17' W) entre os meses de junho de 2024 e março de 2025. A temperatura do ar e a umidade relativa foram monitoradas por meio de um datalogger modelo AK 174 (Akso). A temperatura média na câmara de nebulização variou de 24 a 27 °C e a umidade relativa do ar oscilou entre 85 e 98%. Na casa de vegetação a temperatura variou de 26 a 41° e foi registrada a oscilação de umidade relativa entre 49 e 97%.

Formação das minicepas

As minicepas utilizadas foram obtidas a partir de três origens distintas: duas provenientes de semeaduras realizadas em épocas diferentes e uma resultante de resgate vegetativo de árvores com 7 anos, em um teste de progênie. As minicepas com cinco anos foram originadas de sementes coletadas em árvores matrizes localizadas em Magé, RJ (22°44' S, 43°07' W). As minicepas com dois anos foram produzidas a partir de sementes de *Cordia trichotoma* coletadas em Linhares, ES (19°22' S, 40°03' W). O material resgatado foi obtido em um teste de progênie instalado em 2012, em Linhares, Espírito Santo (19°23' S, 40°03" W) (Santos et al., 2021).

O resgate envolveu 17 árvores superiores, originadas de sementes coletadas na reserva da empresa Vale em fragmentos florestais localizados entre os municípios de Linhares e Sooretama, ambos no Espírito Santo. As brotações epicórmicas, obtidas de galhos da copa, foram tratadas com AIB a 1500 mg L⁻¹ para indução do enraizamento. As plantas enraizadas foram cultivadas em vasos de 7 L, contendo mistura de Basaplant®, areia e composto orgânico na proporção 2:1:1 (v/v/v).

Na tentativa de multiplicar as minicepas do minijardim multiclonal, ensaios preliminares envolvendo o método de propagação proposto por Silva et al. (2022) indicaram que miniestacas provenientes de minicepas com cinco anos após a

semeadura, bem como aquelas obtidas de materiais resgatados, não responderam ao protocolo (dados não publicados), o que motivou desenvolvimento de novos protocolos de enraizamento.

Experimento 1: Miniestaquia de dois materiais de origem seminal e diferentes graus de maturação de *C. trichotoma*

Coleta e preparo das miniestacas

A fim de realizar a miniestaquia de materiais de origem seminal de diferentes idades, para cada material foram coletadas miniestacas de 5 a 7 cm de comprimento, contendo uma folha reduzida à metade. Foram confeccionadas 400 miniestacas do material de dois anos de idade e 400 do material de cinco anos de idade. As bases das miniestacas foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 0,5% por 5 minutos, sendo posteriormente enxaguadas em água deionizada. A coleta, preparo e separação das miniestacas foram realizadas imediatamente antes do início dos tratamentos, visando garantir uniformidade experimental.

Delineamento experimental

Foi instalado um experimento em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x2x5, com quatro repetições e 10 miniestacas por parcela. O fator 1 correspondeu às idades das minicepas, dois e cinco anos. O fator 2 correspondeu às concentrações de H₂O₂ (0 e 50 mmol.L⁻¹), aplicadas por imersão da base das miniestacas por 8 horas. O fator 3 correspondeu às concentrações de AIB: 0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg L⁻¹. A aplicação de AIB foi realizada por imersão da base das miniestacas por 15 segundos e as soluções de AIB foram preparadas a

partir de solução estoque, diluindo-se o regulador previamente solubilizado em hidróxido de sódio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e completando-se o volume com água deionizada.

Análises biométricas

O estaqueamento foi realizado em tubetes de 280 cm^3 , preenchidos com substrato Basaplant® previamente adubado com fertilizante de liberação lenta (NPK 15-9-12, 8 g kg^{-1}). Os tubetes foram dispostos em câmara de nebulização, onde permaneceram por 60 dias. Em seguida, o material foi transferido para casa de vegetação por mais 120 dias, totalizando 180 dias até o momento da avaliação final.

Em função da baixa sobrevivência observada nas miniestacas provenientes de minicepas com cinco anos de idade, o esquema fatorial $2 \times 2 \times 5$ (Idade \times $\text{H}_2\text{O}_2 \times$ AIB) foi ajustado. Para garantir os pressupostos da análise de variância, análises estatísticas foram realizadas exclusivamente com o material proveniente de minicepas de dois anos, utilizando um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e 10 miniestacas por parcela, em um fatorial 2×5 ($\text{H}_2\text{O}_2 \times$ AIB).

Na expedição da câmara de nebulização, aos 60 dias, foram avaliadas a sobrevivência e enraizamento ao leve toque, que consiste no movimento suave da miniestaca e se é percebido resistência, considera-se enraizamento. Em seguida, o material foi transferido para casa de vegetação por mais 120 dias. Ao fim dos experimentos, foram quantificadas a sobrevivência e emissão de brotações. De forma adicional, foi realizada remoção cuidadosa do substrato das raízes com o uso de peneiras e água corrente a fim de evitar perdas. Em seguida, foi contado o número de raízes de primeira ordem (NRPO) e medido seu comprimento total (CTRPO), considerando-se apenas as raízes originadas diretamente da base das miniestacas (Barroso et al., 2018a). Também foram obtidas as medidas de altura da parte aérea (A) e diâmetro do colo (DAC), com régua milimetrada e paquímetro digital, respectivamente. Por fim, as porções aérea e radicular das miniestacas foram separadas e secas em estufa com circulação de ar forçada a 70°C por 72 horas, para determinação da massa seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR), respectivamente.

A partir dessas variáveis, foi calculado o Índice de Qualidade de Dickson (IQD), que expressa a qualidade das mudas com base na robustez do sistema radicular e na distribuição equilibrada da biomassa (Dickson et al., 1960).

$$IQD = \frac{MST}{\frac{A}{DAC} + \frac{MSPA}{MSSR}} \quad (\text{Eq.1})$$

Onde:

IQD- Índice de desenvolvimento de Dickson;

MST- Massa seca total (g); A-Altura (cm);

DAC) Diâmetro à altura do colo (cm);

MSPA - massa seca da parte aérea (g);

MSSR- massa seca do sistema radicular seca da raiz (g).

As etapas listadas nessa subseção encontram-se esquematizadas na Figura

2.

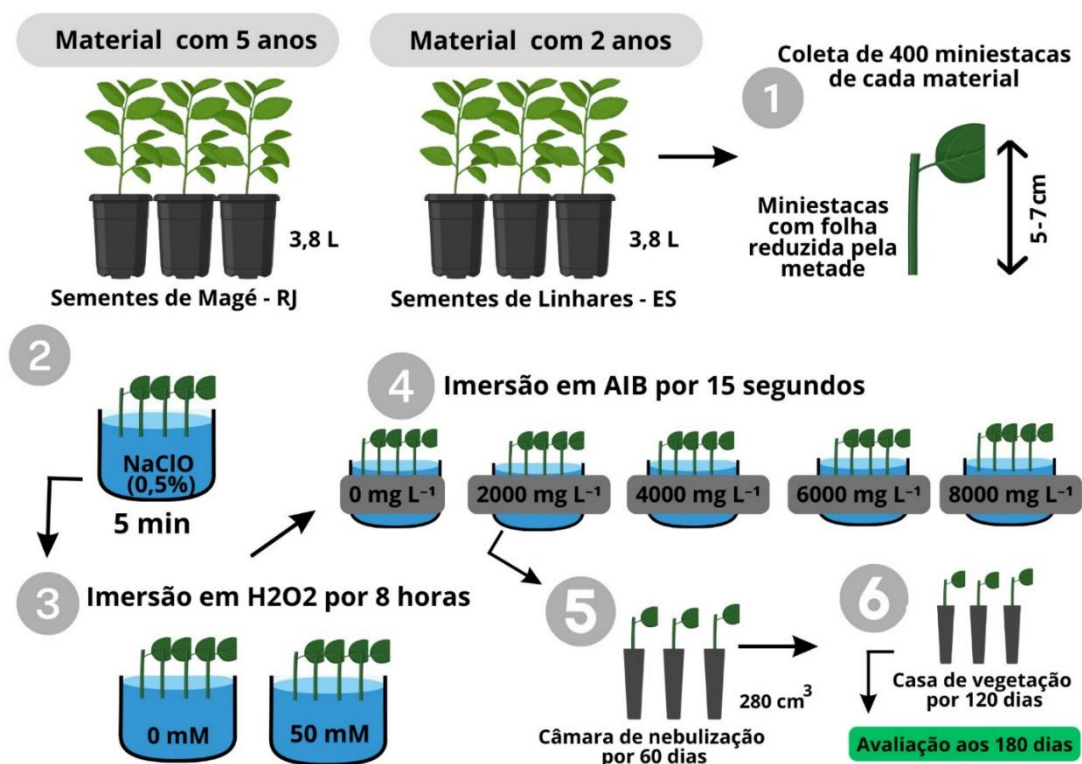


Figura 2. Esquema das etapas adotadas no experimento de enraizamento de miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de minicepas com dois e cinco anos de idade. (1) Coleta de 400 miniestacas de cada material, com folha reduzidas à metade e comprimento de 5 a 7 cm; (2) desinfecção em solução de NaClO (0,5%) por 5min; (3) imersão em H₂O₂ (0 e 50 mmol.L⁻¹) por 8h; (4) imersão em AIB (0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg L⁻¹) por 15s; (5) estaqueamento em tubetes de 280 cm³, mantidos em câmara de nebulização por 60 dias; e (6) expedição à casa de vegetação por 120 dias, com avaliações realizadas aos 180 dias após a instalação do experimento.

Análise de dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para isso, os pressupostos do modelo foram inicialmente verificados por meio do teste de verossimilhança máxima (Box-Cox), utilizando o pacote MASS (Venables e Ripley, 2002). Quando indicado, foram realizadas as transformações sugeridas pelo teste. Em seguida, foi realizada a ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$), com o auxílio do pacote

agricolae (De Mendiburu, 2019). As concentrações de AIB, quando significativas, foram submetidas a ajustes de regressão e à ANOVA dos modelos ajustados. Os coeficientes de determinação, quando calculados, foram inferiores à 30%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team, 2019).

Experimento 2: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes em materiais de diferentes graus de maturação de *C. trichotoma*

Coleta e preparo das miniestacas

As miniestacas coletadas foram padronizadas com 5 a 7 cm de comprimento e uma folha reduzida à metade. Após a desinfecção da base das miniestacas em hipoclorito de sódio a 0,5% por 5 minutos, o experimento foi definido.

Delineamento experimental

As miniestacas foram organizadas em um experimento em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições e 20 miniestacas por parcela. Os materiais foram caracterizados quanto à atividade de enzimas antioxidantes e quantificação de hormônios em função da idade e origem da matriz. Para tanto, foram coletados materiais de três diferentes idades, os quais constituíram os tratamentos considerados no experimento: (i) minicepas de origem seminal 2 anos, (ii) minicepas de origem seminal 5 anos, e (iii) minicepas de origem clonal 5 anos após resgate. Tais materiais foram cortados e macerados em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em ultrafreezer a -80°C para posterior análise laboratorial, conforme estabelecido por Rodrigues et al. (2023).

Análises hormonais

As análises hormonais foram feitas conforme proposto por Oliveira et al. (2022), com adaptações. Em função da dureza do material, ele foi remacerado para obtenção de um pó fino para cada amostra, adequado para a extração dos hormônios. As quantificações foram realizadas por cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UPLC), e os resultados expressos em nanogramas por grama de massa fresca (ng g^{-1} MF).

Análises enzimáticas

Nas análises enzimáticas, foi confeccionado um extrato único por amostra, no qual foram determinadas as atividades de todas as enzimas em meios reacionais específicos. Para isso, 500 mg de tecido vegetal previamente macerado em nitrogênio líquido foi homogeneizado com polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 30% e 5 mL de tampão de extração [fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8; ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM; ditioneitol (DTT) 1 mM], utilizando almofariz e pistilo. O homogenato obtido foi filtrado em quatro camadas de gaze e, em seguida, centrifugado a 10.000 g por 20 minutos a 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante utilizado para as determinações das atividades enzimáticas.

As enzimas antioxidantes foram avaliadas conforme os seguintes autores: DHAR e APX segundo Nakano e Asada (1981); MDHAR conforme Arrigoni et al. (1981); GR segundo Sagisaka (1982); POX conforme Kar e Mishra (1976); CAT de acordo com Havir e Mchale (1987); e SOD segundo Giannopolis e Reis (1977). Todas elas foram quantificadas por espectrofotometria e suas atividades foram ajustadas pela quantidade de proteína presente na amostra quantificada pelo método de Bradford (1976). Os procedimentos experimentais encontram-se resumidos na Figura 3.

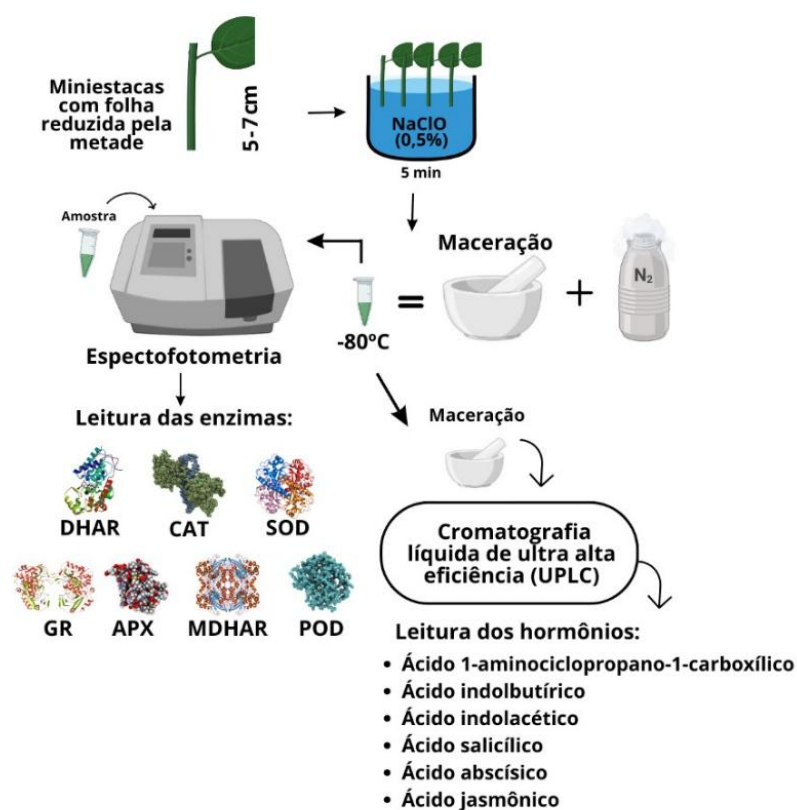


Figura 3. Esquema das etapas de preparo e análises bioquímicas em miniestacas de *Cordia trichotoma*. Após desinfecção em NaClO (0,5%) e maceração em nitrogênio líquido, as amostras foram submetidas à leitura enzimática por espectrofotometria, avaliando as enzimas dehidroascorbato redutase (DHAR), glutatona redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX), monodeidroascorbato redutase (MDHAR), peroxidase (POD), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Paralelamente, a quantificação hormonal foi realizada por cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UPLC), incluindo ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (AJ).

Análise de dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para isso, os pressupostos do modelo foram inicialmente verificados por meio do teste de

verossimilhança máxima (Box-Cox), utilizando o pacote MASS (Venables e Ripley, 2002). Quando indicado, foram realizadas as transformações sugeridas pelo teste. Em seguida, foi realizada a ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$), com o auxílio do pacote agricolae (De Mendiburu, 2019).

De modo complementar, a fim de integrar as informações obtidas e identificar padrões de variação entre os tratamentos, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA), que possibilitou visualizar a estrutura multivariada dos dados e agrupar padrões associados à idade e à origem das miniestacas. Foram considerados os escores dos dois primeiros componentes principais, responsáveis pela maior proporção da variância explicada. Os gráficos obtidos foram plotados no ambiente R com uso do pacote ggbiplot (Vu, 2011). Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software R (R Core Team, 2019).

Experimento 3: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes sob efeito de tratamentos de enraizamento em miniestacas de *C. trichotoma*

Coleta e preparo das miniestacas

As miniestacas utilizadas foram coletadas, padronizadas com 5 a 7 cm de comprimento e uma folha reduzida à metade. Também foi realizada a desinfecção da base em hipoclorito de sódio a 0,5% por 5 minutos, conforme descrito nos experimentos anteriores.

Delineamento experimental

As miniestacas foram alocadas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições e 30 miniestacas por parcela. Foram adotados três tratamentos: (i) imersão da base em 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ por 8 horas, seguida de 12 horas em 300 mg L⁻¹ de AIB com aeração forçada na última etapa; (ii) imersão em

água deionizada por 20 horas, com aeração nas últimas 12 horas; e (iii) controle, com miniestacas recém-coletadas. No momento do estaqueamento, um terço das miniestacas de cada tratamento foi destinado à análise hormonal e outro terço à análise enzimática. As análises enzimáticas e hormonais seguiram os mesmos procedimentos metodológicos descritos no experimento anterior. As demais miniestacas foram estaqueadas em ambiente de nebulização intermitente para posterior avaliação de variáveis morfológicas e de crescimento das mudas.

Análises biométricas

As análises biométricas foram realizadas conforme descrito no Experimento 1, seguindo o mesmo procedimento para coleta, estaqueamento, condução em câmara de nebulização e casa de vegetação, bem como para a avaliação das variáveis de sobrevivência, enraizamento, crescimento e qualidade das mudas.

Análises enzimáticas e hormonais

Foram adotados os mesmos procedimentos descritos no experimento 2 para as análises enzimáticas e hormonais. Os procedimentos adotados no presente experimento estão esquematizados na Figura 4.

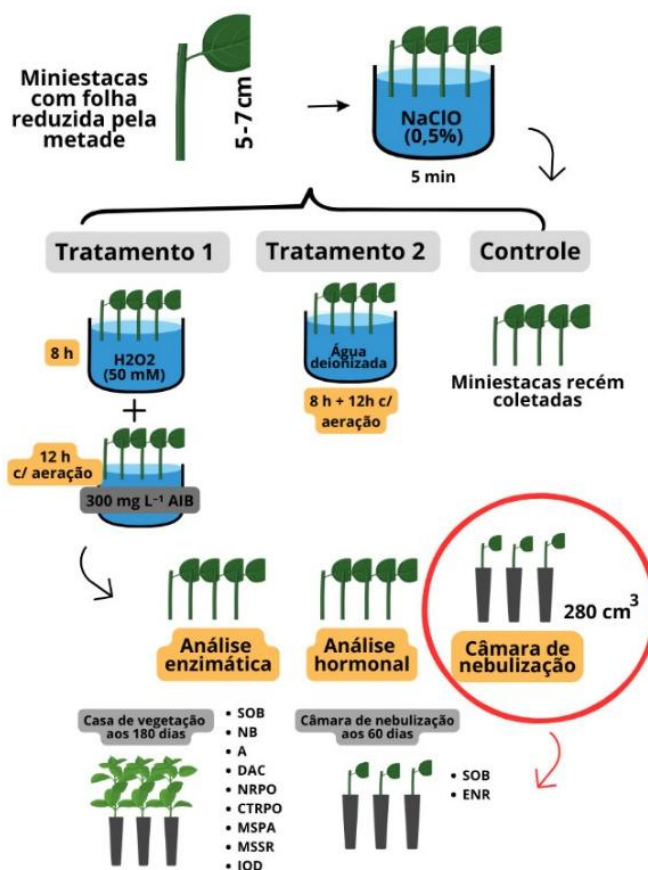


Figura 4. Esquema dos tratamentos e etapas experimentais adotados no enraizamento de miniestacas de *Cordia trichotoma*. Os tratamentos consistiram em: Tratamento 1 – imersão em H₂O₂ (50 mmol.L⁻¹) por 8 horas seguida de imersão em AIB (300 mg L⁻¹) por 12 horas, com aeração forçada na última etapa; Tratamento 2 – imersão em água deionizada por 8 horas seguida de 12 horas, com aeração forçada na última etapa; e Controle – miniestacas recém-coletadas. Após os tratamentos, dois terços das miniestacas foram destinadas às análises enzimáticas e hormonais, e um terço foi destinado à etapa de enraizamento.

Análise de dados

Os dados biométricos foram submetidos à ANOVA, adotando o mesmo procedimento descrito nos experimentos anteriores. Os dados obtidos nas análises

enzimáticas e hormonais também foram submetidos à ANOVA. Para visualizar a estrutura multivariada dos dados fisiológicos e agrupar padrões associados à idade, à origem das miniestacas ou aos tratamentos de enraizamento aplicados às miniestacas juvenis, foi aplicada uma PCA conforme procedimento descrito no experimento 2.

RESULTADOS

Experimento 1: Miniestaquia de dois materiais de origem seminal e diferentes graus de maturação de *C. trichotoma*

Com base em testes preliminares, a sobrevivência das miniestacas de *C. trichotoma* foi significativamente influenciada pela idade das minicepas, conforme ilustrado na Figura 5.

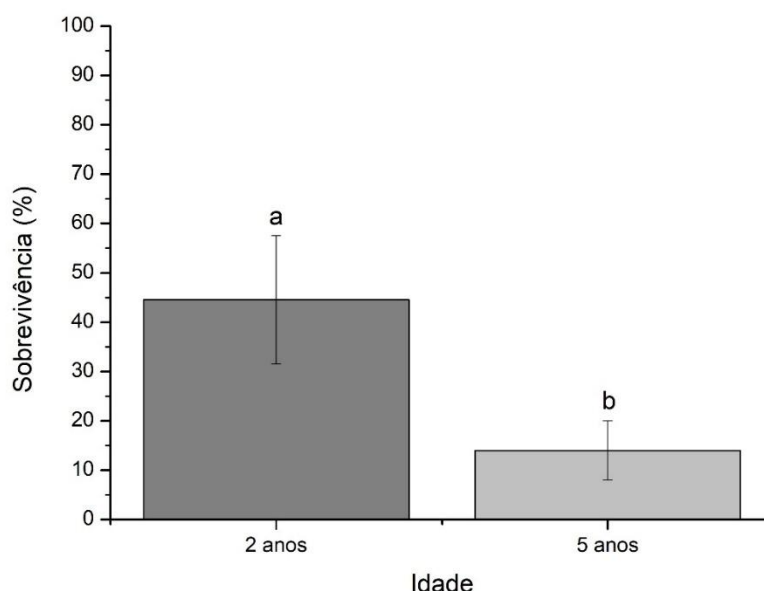


Figura 5. Sobrevivência de miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de minicepas com 2 e 5 anos após a semeadura, tratadas com diferentes concentrações de AIB (0, 2000, 4000, 6000 ou 8000 mg L⁻¹) e H₂O₂ (0 ou 50 mmol.L⁻¹). Os valores representam a média geral dos tratamentos com AIB e H₂O₂ para cada idade. Barras finas indicam erro-padrão da média. Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste F (p<0,05).

As miniestacas provenientes de minicepas com dois anos de idade apresentaram maior taxa de sobrevivência (44,5%) em comparação àquelas oriundas de minicepas com cinco anos (14%). Os dados sugerem que o aumento da idade afetou a capacidade de enraizamento das miniestacas. Assim, é possível inferir que o avanço da idade não atua negativamente somente no enraizamento de propágulos de plantas adultas, conforme já reportado (Silva et al., 2021), mas também em materiais juvenis da espécie.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da análise de variância (ANOVA) para as características biométricas avaliadas nas mudas produzidas a partir de minicepas de dois anos.

Tabela 1. Características avaliadas no enraizamento de miniestacas de *Cordia trichotoma* produzidas a partir de minicepas com 2 anos após a semeadura, submetidas a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido indolbutírico (AIB). Médias seguidas de ns (não significativo) na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tratamento				Variáveis													
H ₂ O ₂																	
(mmoles.L ⁻¹)	AIB (mg.L ⁻¹)	SE (%)		SCV(%)		ST(%)		Brotação(%)		NRPO		CTRPO(cm)		MSSR(g)		IQD	
0	0	60	ns	88,8	ns	52,5	ns	25,00	ns	1,33	ns	28,25	ns	0,11	ns	0,08	ns
0	2000	77,5	ns	60,6	ns	50	ns	22,50	ns	2,25	ns	35,90	ns	0,76	ns	0,34	ns
0	4000	80	ns	78,8	ns	62,5	ns	27,50	ns	2,96	ns	47,66	ns	0,87	ns	0,40	ns
0	6000	45	ns	83,3	ns	40	ns	22,50	ns	2,38	ns	50,29	ns	0,63	ns	0,30	ns
0	8000	62,5	ns	58,0	ns	37,5	ns	32,50	ns	2,92	ns	57,12	ns	0,51	ns	0,29	ns
50	0	55	ns	77,1	ns	40	ns	22,50	ns	1,50	ns	46,15	ns	0,42	ns	0,25	ns
50	2000	47,5	ns	66,9	ns	27,5	ns	22,50	ns	1,61	ns	26,80	ns	0,47	ns	0,26	ns
50	4000	80	ns	67,2	ns	52,5	ns	37,50	ns	3,50	ns	49,48	ns	0,77	ns	0,37	ns
50	6000	65	ns	73,9	ns	47,5	ns	22,50	ns	2,92	ns	52,29	ns	1,01	ns	0,50	ns
50	8000	40	ns	83,3	ns	35	ns	25,00	ns	3,28	ns	64,03	ns	0,92	ns	0,43	ns
Coeficiente de Variação (%)		18,57		16,26		24,3		19,76		31,82		21,4		24,8		25,68	

SE= Sobrevivência na expedição da câmara de nebulização (60 dias após o estaqueamento); SCV= Sobrevivência na casa de vegetação (120 dias na casa de vegetação); ST=Sobrevivência total, aos 180 dias; Brotação= porcentagem de plantas que emitiram novas brotações; NRPO=Número de raízes adventícias de primeira ordem; CTRPO= comprimento total de raízes adventícias de primeira ordem, MSSR=massa seca do sistema radicular; IQD= índice de qualidade de Dickson (IQD)

Não houve efeito significativo para as características da Tabela 1. A maior mortalidade das miniestacas foi registrada na expedição da câmara de nebulização, aos 60 dias. Nessa mesma época foi avaliado o enraizamento ao leve toque (Figura 6).

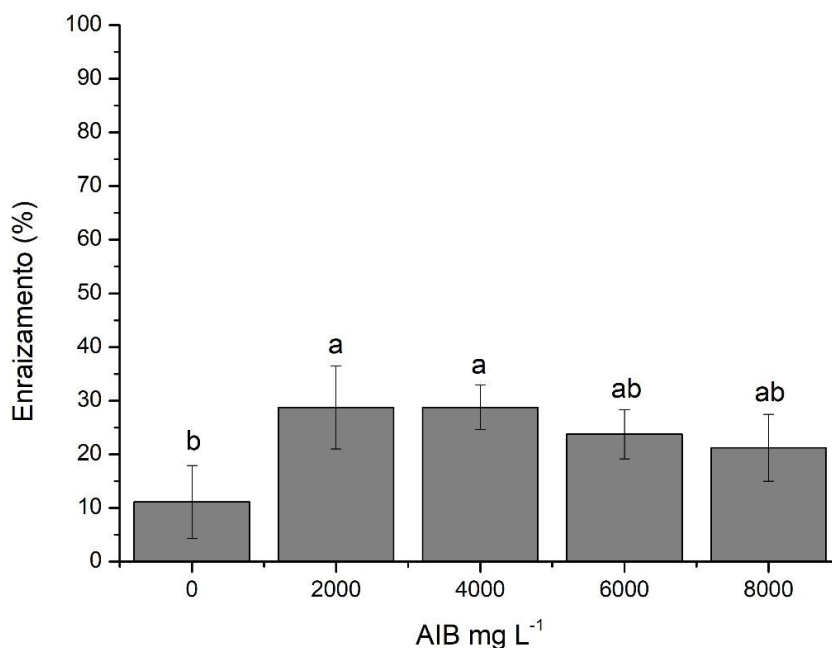


Figura 6. Enraizamento de miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de minicepas com 2 anos de idade submetidas a diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) aos 60 dias. Barras finas representam erro-padrão da média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A aplicação de AIB promoveu incremento no enraizamento das miniestacas, nas concentrações de 2000 e 4000 mg L⁻¹. O enraizamento aumentou de aproximadamente 12% para quase 30% nessas concentrações, indicando efeito positivo da auxina no estímulo ao enraizamento. A altura das mudas, aos 180 dias, também foi afetada pelas concentrações de AIB (Figura 7).

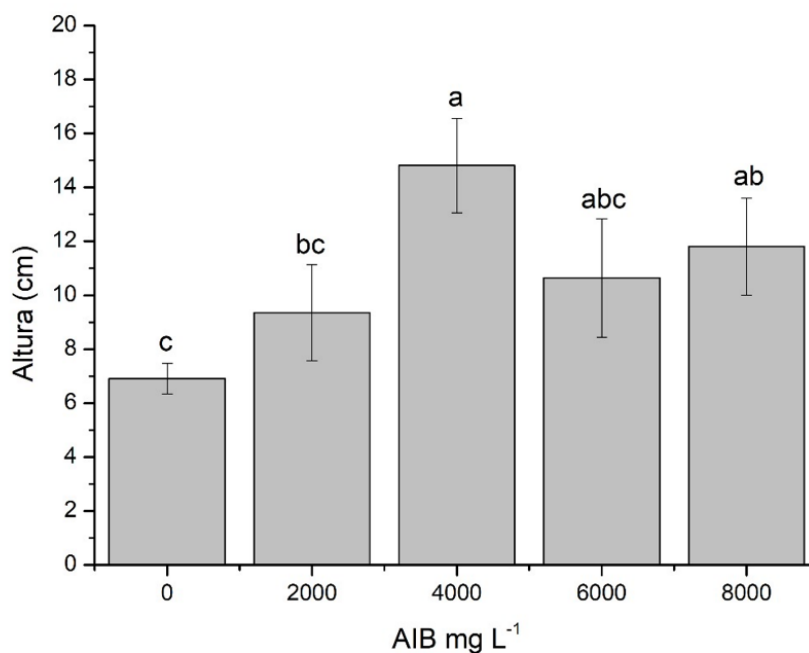


Figura 7. Altura média de mudas de *Cordia trichotoma* oriundas de minicepas com 2 anos de idade, submetidas a diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB), aos 180 dias. Barras finas indicam o erro-padrão da média. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A altura das mudas foi positivamente influenciada pela aplicação de AIB, com resposta máxima observada na concentração de 4000 mg L⁻¹. A concentração de 8000 mg. L⁻¹ também diferiu do controle, embora represente uma queda de aproximadamente 21% na altura das plantas em relação à concentração ótima. Variações nas concentrações de AIB também impactaram o diâmetro das mudas (Figura 8).

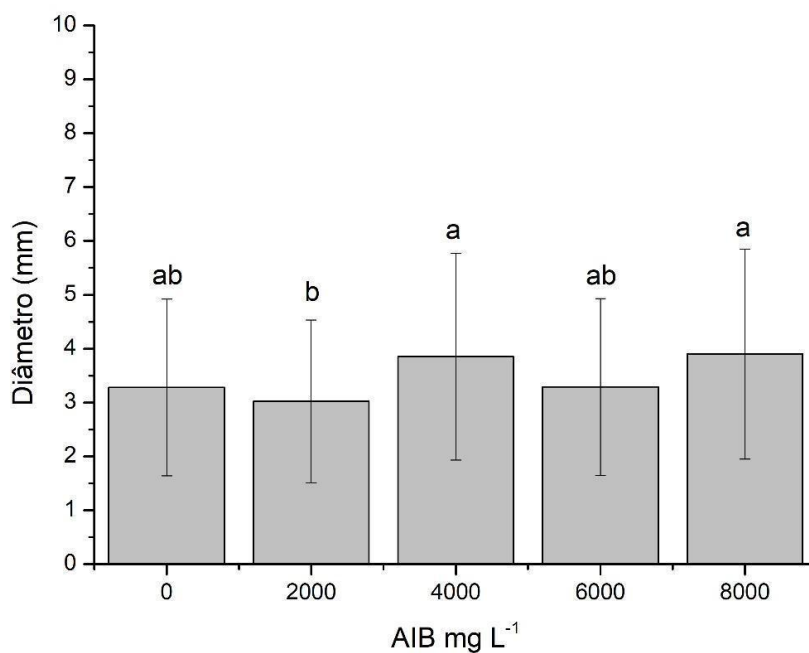


Figura 8. Diâmetro à altura do colo de mudas de *Cordia trichotoma* oriundas de minicepas com 2 anos de idade, submetidas a diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) aos 180 dias. Barras finas indicam o erro-padrão da média. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No caso do diâmetro do caule, apesar das variações indicadas no teste de Tukey, as concentrações de AIB testadas não promoveram incrementos significativos em relação ao controle (0 mg L^{-1}). Houve diferenças na massa seca da parte aérea das mudas em função das concentrações de AIB (Figura 9).

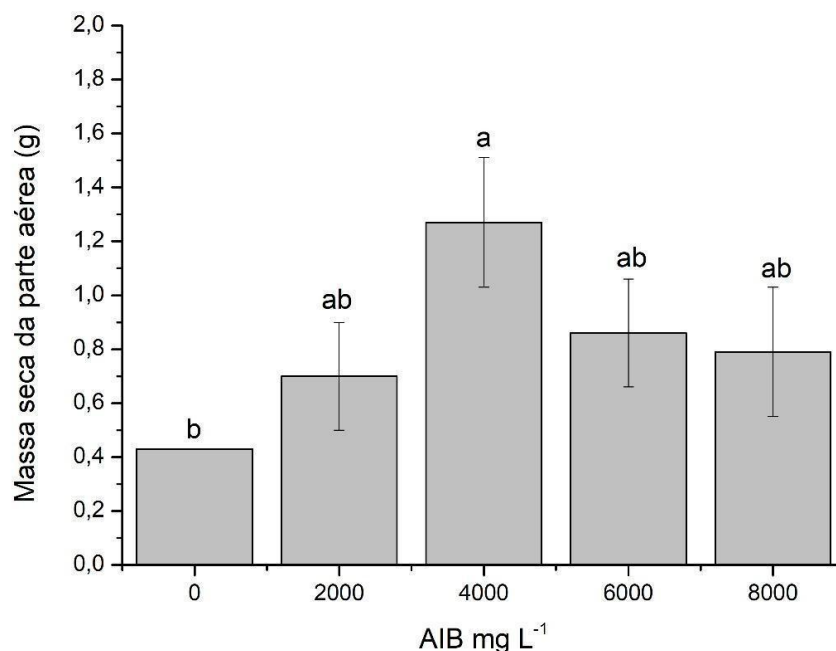


Figura 9. Massa seca da parte aérea (MSPA) de miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de minicepas com 2 anos de idade, submetidas a diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) aos 180 dias. Barras finas indicam o erro-padrão da média. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A aplicação de 4000 mg L⁻¹ de AIB triplicou a MSPA em comparação ao grupo controle, evidenciando a eficácia do tratamento sobre a alocação de biomassa na parte aérea. Esse incremento pode estar associado ao maior enraizamento promovido por essa concentração, o que favoreceu o estabelecimento das miniestacas e, consequentemente, o crescimento vegetativo. O mesmo foi observado na variável altura, sugerindo que formação radicular contribuiu para a alocação de biomassa na parte aérea. Dessa forma, a concentração de 4000 mg L⁻¹ reforça sua influência no impulsionamento do crescimento das mudas.

De modo geral, os resultados demonstram que a aplicação de 4000 mg L⁻¹ de AIB promoveu efeitos positivos sobre o enraizamento, altura e massa seca da parte aérea de miniestacas juvenis de *C. trichotoma*.

Experimento 2: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes em materiais de diferentes graus de maturação de *C. trichotoma*

Os gráficos que representam o teste Tukey para cada variável estão representados na Figura 10.

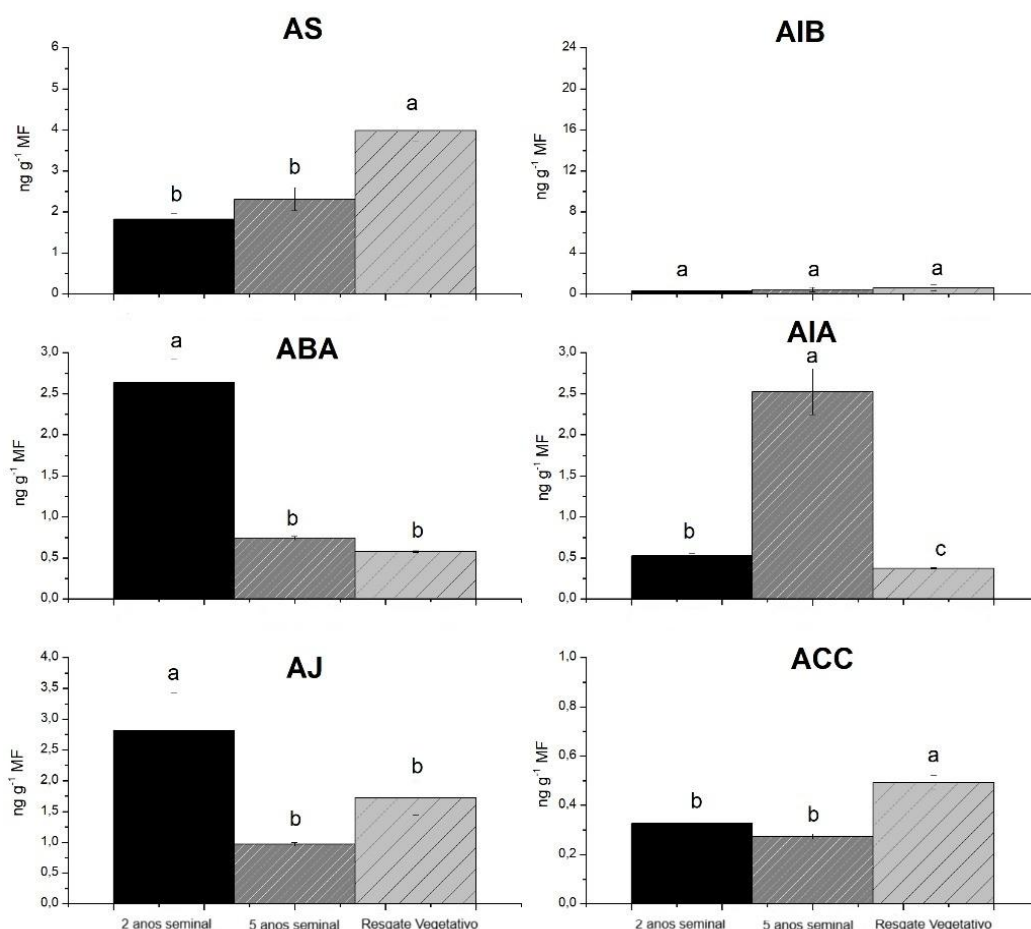


Figura 10. Conteúdo endógeno dos hormônios ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC); ácido indolbutírico (AIB); ácido indolacético (AIA); ácido salicílico (AS); ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (AJ) em miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de três tipos de matrizes: (i) origem seminal 2 anos, (ii) origem seminal 5 anos, e (iii) origem clonal 5 anos após resgate. As concentrações foram quantificadas em nanograma por grama de massa fresca (MF). Barras finas representam o erro-padrão da média. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos para cada hormônio, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erros.

O material seminal com dois anos apresentou destaque para as concentrações mais elevadas de ABA e AJ, enquanto os níveis de AS, AIB, AIA e ACC

permaneceram baixos. Já o material seminal com cinco anos foi caracterizado pelo maior acúmulo AIA, associado ainda a concentrações mais baixas de ABA, AJ e AS. Por sua vez, o material de resgate vegetativo destacou-se pela maior concentração de AS e do precursor do etileno, ACC, além de menores concentrações de AIA e ABA, configurando um perfil hormonal distinto em relação aos demais materiais.

A PCA permitiu separar os três materiais avaliados com base em seus perfis hormonais, explicando 72,3% da variância total nas duas primeiras componentes principais (Figura 11).

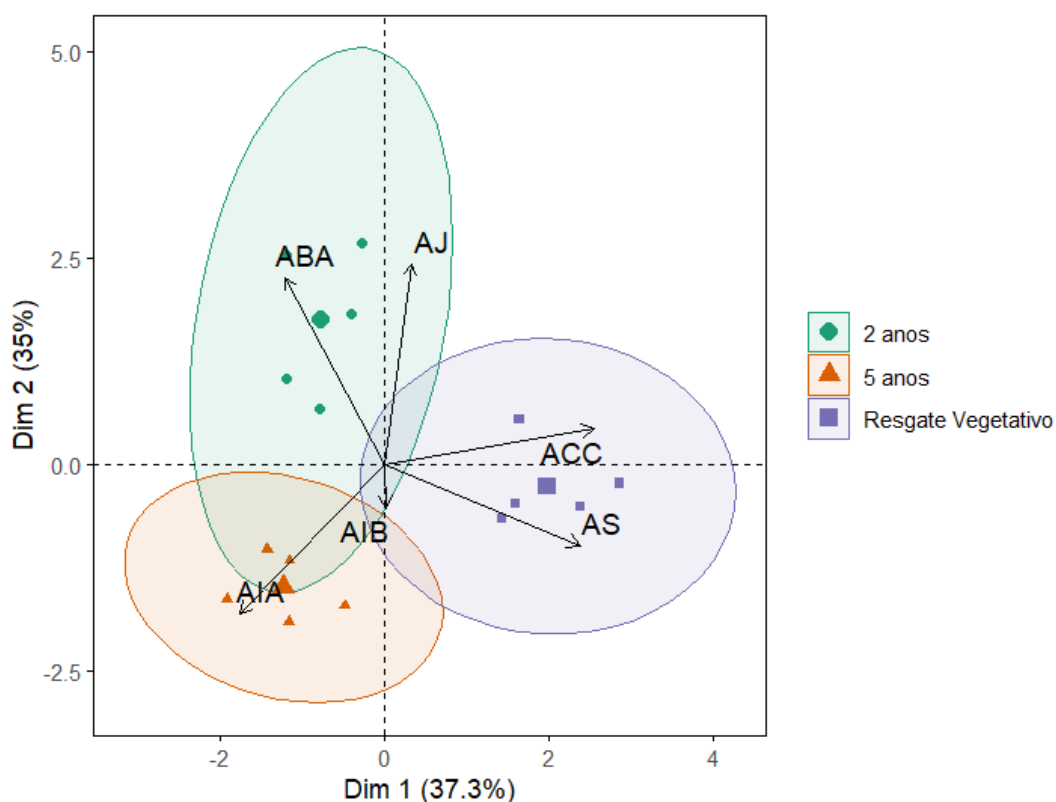


Figura 11. Análise de Componentes Principais com base no conteúdo endógeno dos hormônios ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC); ácido indolbutírico (AIB); ácido indolacético (AIA); ácido salicílico (AS); ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (AJ) em miniestacas de *Cordia trichotoma* de três tipos de matrizes: (i) origem seminal 2 anos, (ii) origem seminal 5 anos, e (iii) origem clonal 5 anos após resgate. As elipses coloridas representam os agrupamentos por material, e os vetores indicam a contribuição dos hormônios para a variação explicada nas duas primeiras dimensões principais (Dim 1 = 37,3%; Dim 2 = 35%).

As miniestacas oriundas do material de dois anos formaram um agrupamento bem definido no quadrante superior esquerdo do gráfico, com associação a AJ e ABA, conforme indicado pela direção e magnitude dos vetores. Esse padrão sugere a presença de um perfil hormonal caracterizado pela ativação de vias relacionadas à maturação e ao estresse, mesmo em tecidos juvenis, o que pode refletir que aos dois anos já há perfil recalcitrante ao enraizamento adventício.

Por outro lado, o material resgatado foi agrupado no quadrante inferior direito, associado ao AS e ao ACC, hormônios frequentemente relacionados à sinalização de

estresse e senescência. Esse padrão sugere que esses reguladores tendem a se acumular em materiais com menor competência ao enraizamento. A baixa proximidade do vetor de AIA em relação ao grupo resgatado indica um reduzido acúmulo endógeno dessa auxina nos tecidos, o que reforça a hipótese de que a limitação ao enraizamento nesse material pode estar associada ao balanço hormonal desfavorável à indução de raízes adventícias.

O material oriundo das minicepas de cinco anos agrupou-se no quadrante inferior esquerdo, associado ao vetor de AIA, o que não era esperado dado a idade do material e achados para o material juvenil, que não foi associado a nenhuma auxina. A relativa proximidade de AIB com o centro da PCA, sem associação com nenhum grupo confirma que sua presença nos tecidos é naturalmente baixa.

A Figura 12 reafirma os agrupamentos observados no teste de médias e reforça que os materiais mais juvenis apresentam maiores níveis de ABA e AJ. Por outro lado, o material resgatado é caracterizado pelo acúmulo de AS e ACC, que são hormônios classicamente associados ao estresse, defesa e senescência, refletindo um estado fisiológico desfavorável à rizogênese. O material com cinco anos de idade ocupa uma posição de transição, com destaque para o acúmulo de AIA, mas com redução geral dos demais hormônios.

As mesmas análises foram feitas considerando os dados obtidos das atividades das enzimas antioxidantes (Figura 12).

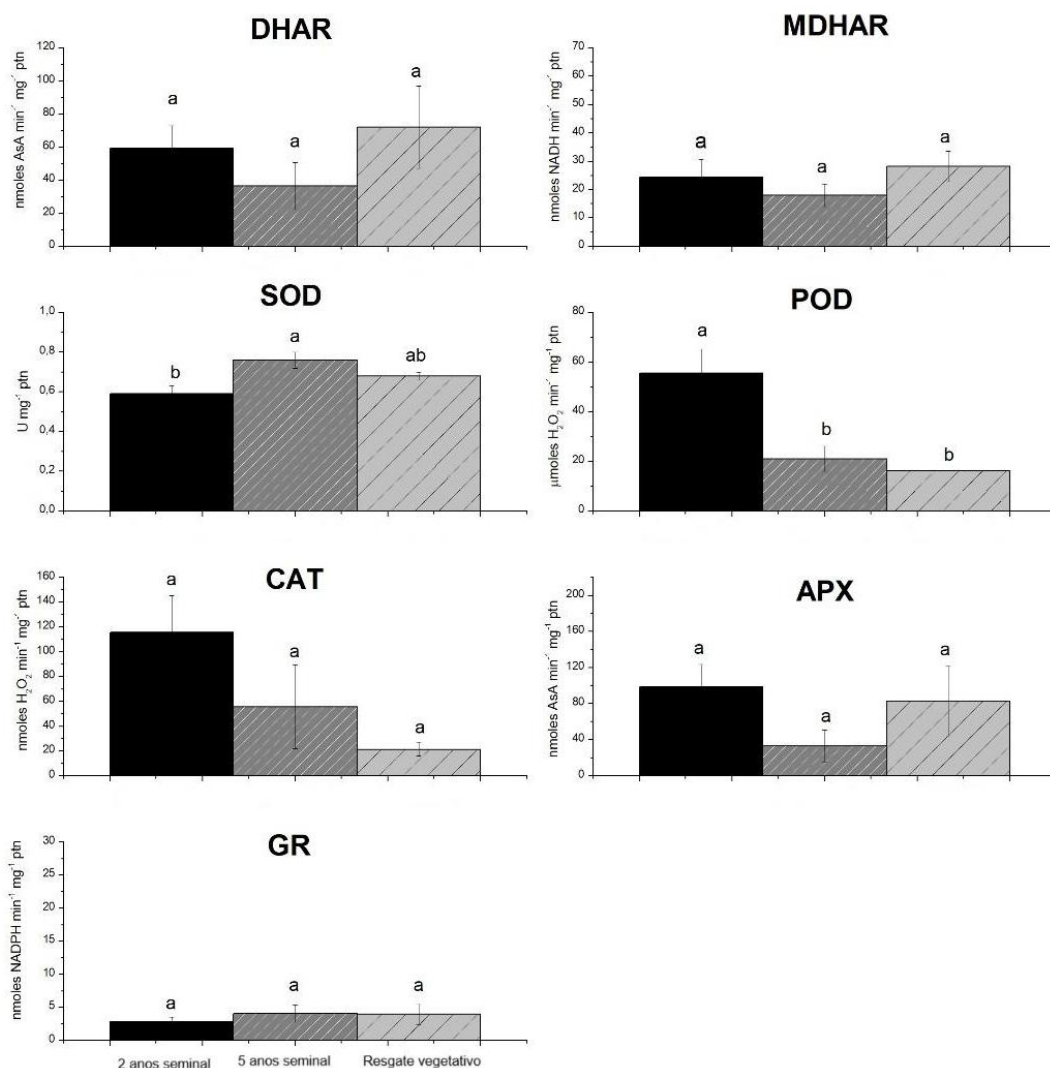


Figura 12. Atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX); catalase (CAT); dehidroascorbato redutase (DHAr); glutatona redutase (GR); monodehidroascorbato redutase (MDHAr); peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de três tipos de matrizes: (i) minicepas com 2 anos de idade; (ii) minicepas com 5 anos de idade; e (iii) minicepas resgatadas vegetativamente. As atividades enzimáticas foram expressas em unidades específicas por miligrama de proteína, de acordo com o substrato e a reação de cada enzima. Barras finas representam o erro-padrão da média, e letras distintas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos para cada enzima, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Miniestacas de minicepas de origem seminal e dois anos de cultivo apresentaram maior atividade de POD, indicando uma atuação mais eficiente na eliminação de H_2O_2 . A enzima SOD teve maior atividade nos materiais de minicepas com cinco anos de idade e das oriundas de resgate vegetativo de plantas adultas, sugerindo acúmulo inicial de superóxidos nesse grupo. Esse fato pode justificar a baixa responsividade observada nos tratamentos de enraizamento com H_2O_2 como coadjuvante, sugerindo a necessidade de testar outros antioxidantes para estes materiais.

Assim como no ensaio de hormônios, foi conduzida PCA que reafirmou os padrões encontrados no teste de Tukey (Figura 13).

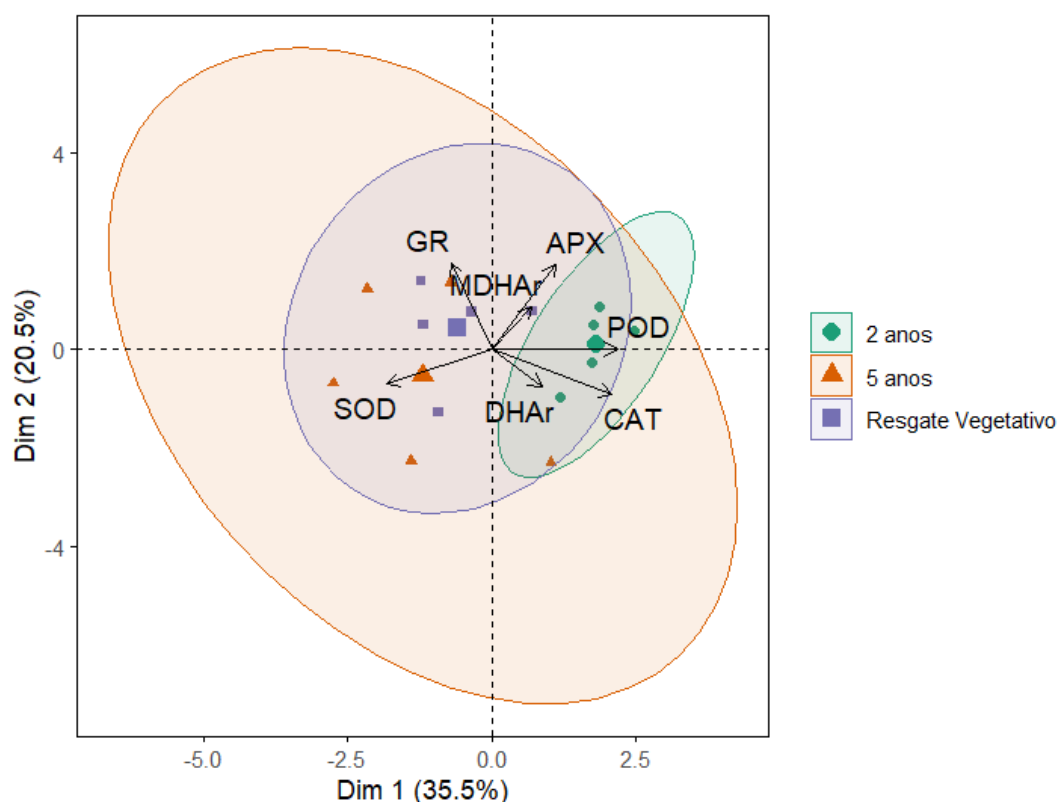


Figura 13. Análise de Componentes Principais com base nas médias das atividades das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX); catalase (CAT); dehidroascorbato redutase (DHAr); glutathiona redutase (GR); monodehidroascorbato redutase (MDHAr); peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de três tipos de matrizes: (i) minicepas com 2 anos de idade; (ii) minicepas com 5 anos de idade; e (iii) minicepas resgatadas vegetativamente. As elipses representam o agrupamento dos tratamentos conforme similaridade, e os vetores indicam a contribuição das enzimas para a variação total explicada nas duas primeiras componentes (Dim 1 = 35,5%; Dim 2 = 20,5%).

Foi possível observar tendência de separação entre os materiais com base nas atividades das enzimas antioxidantes (Figura 13). As miniestacas de dois anos e as provenientes do resgate vegetativo apresentaram agrupamentos parcialmente distintos, enquanto o material de cinco anos mostrou maior dispersão e sobreposição em relação aos demais. A elipse correspondente ao grupo de cinco anos abrange pontos localizados nas regiões ocupadas pelos outros dois grupos, indicando que

esse material apresenta respostas enzimáticas mais heterogêneas. Observa-se que as enzimas CAT e POD, associadas à detoxificação direta do H_2O_2 , apresentaram maior correlação com o grupo de dois anos, sugerindo uma resposta antioxidante mais eficiente neste material. Por outro lado, GR, MDHAR e APX estiveram associadas ao grupo resgatado. A observação restrita aos hormônios não permitiu identificar essa relação de forma clara (Figura 1).

Foi possível observar tendência de separação entre os materiais com base nas atividades das enzimas antioxidantes (Figura 13). As miniestacas de dois anos e as provenientes do resgate vegetativo apresentaram agrupamentos parcialmente distintos, enquanto o material de cinco anos mostrou maior dispersão e sobreposição em relação aos demais. O agrupamento das enzimas presentes no material de cinco anos foi mais amplo abrangendo aos outros dois grupos. Esta observação indica que esse material apresenta maior amplitude no tipo de enzima antioxidante envolvida no desenvolvimento radicular das miniestacas. Vale destacar, porém, que apesar dessa amplitude, o nível de atividade dessas enzimas antioxidantes no material de cinco anos não foi superior em relação aos demais materiais (Figura 13). Observa-se que as enzimas CAT e POD, associadas à detoxificação direta do H_2O_2 , apresentaram maior correlação com o grupo de dois anos, sugerindo uma resposta antioxidante mais eficiente neste material. Por outro lado, SOD, GR, MDHAR e APX estiveram associadas ao grupo resgatado.

A atividade de enzimas de miniestacas provenientes de resgate vegetativo foi agrupada na região central do gráfico, com leve deslocamento à direita, apresentando maior proximidade com GR e MDHAR. Essa associação sugere que, no material resgatado, a atividade do ciclo ascorbato-glutationa pode estar mais envolvida na resposta antioxidante do que as enzimas diretamente envolvidas na eliminação de H_2O_2 . Esse resultado pode refletir um metabolismo mais lento ou uma regulação oxidativa menos eficiente.

Os pontos referentes às miniestacas de minicepas com cinco anos de idade se distribuíram amplamente no quadrante esquerdo, sendo associadas à SOD. A predominância dessa enzima, que atua na dismutação do radical superóxido, pode ser um indicativo de que esse material apresenta acúmulo inicial desse íon.

Experimento 3: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes sob efeito de tratamentos de enraizamento

As características dendrométricas obtidas na etapa de enraizamento estão apresentadas na tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2. Características dendrométricas de mudas de *Cordia trichotoma* produzidas a partir de minicepas com dois anos após a semeadura, submetidas a três tratamentos: imersão em água deionizada (H₂O), imersão em 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ seguida de 300 mg.L⁻¹ de AIB (H₂O₂ + AIB) e miniestacas recém-coletadas (Controle), aos 6 meses após o estaqueamento. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Tratamentos							
Variável	H ₂ O		H ₂ O ₂ +AIB		Controle		CV(%)
SE (%)	44,00	a	60,00	a	52,00	a	19,80
E (%)	20,00	a	38,00	a	30,00	a	29,89
SCV (%)	92,67	a	95,00	a	80,83	a	7,84
ST (%)	40,00	a	56,00	a	42,00	a	20,00
Altura (cm)	15,20	a	12,74	a	8,45	a	36,28
DAC (mm)	5,15	a	4,08	ab	3,79	b	14,57
B (%)	14,00	a	18,00	a	14,00	a	45,48
CTB (cm)	12,58	a	16,55	a	14,18	a	48,36
NRPO	1,83	a	3,30	a	1,67	a	47,88
CTRPO (cm)	31,58	ab	34,37	a	18,58	b	31,34
MSPA (g)	2,16	a	2,08	a	0,98	a	45,92
MSSR (g)	1,59	a	0,90	b	0,89	b	13,14
IQD	0,88	a	0,55	b	0,56	b	9,14

SE = sobrevivência na expedição da câmara de nebulização (60 dias); E = enraizamento ao leve toque na expedição da câmara de nebulização (60 dias); SCV = sobrevivência na casa de vegetação (120 dias); ST = sobrevivência total (180 dias); A = altura da parte aérea; DAC = diâmetro do colo; B = brotação; NB = número de brotações; CTB = comprimento total de brotações; NRPO = número de raízes de primeira ordem; CTRPO = comprimento total de raízes de primeira ordem; MSPA = massa seca da parte aérea; MSSR = massa seca do sistema radicular; IQD = índice de qualidade de Dickson; CV= coeficiente de variação.

Conforme Tabela 2, não houve efeito significativo entre os tratamentos para a maioria das variáveis avaliadas. Os tratamentos de enraizamento (H_2O e H_2O_2 + AIB) promoveram o mesmo efeito no diâmetro das mudas, sendo detectada diferença entre o tratamento com água e o controle. Estas pequenas diferenças não influenciaram a qualidade das mudas produzidas.

O tratamento com H_2O_2 + AIB estimulou o crescimento em comprimento das raízes, sinalizando que ajustes no protocolo de indução podem potencializar os ganhos já observados em materiais mais jovens (Silva et al., 2022). Assim, a escolha do tratamento pode ser orientada de acordo com os objetivos de produção de mudas, priorizando a qualidade geral das plantas ou favorecendo o comprimento de raízes com a combinação de H_2O_2 + AIB.

A Figura 14 representa as diferenças significativas encontradas nos níveis hormonais em função dos tratamentos via teste de médias.

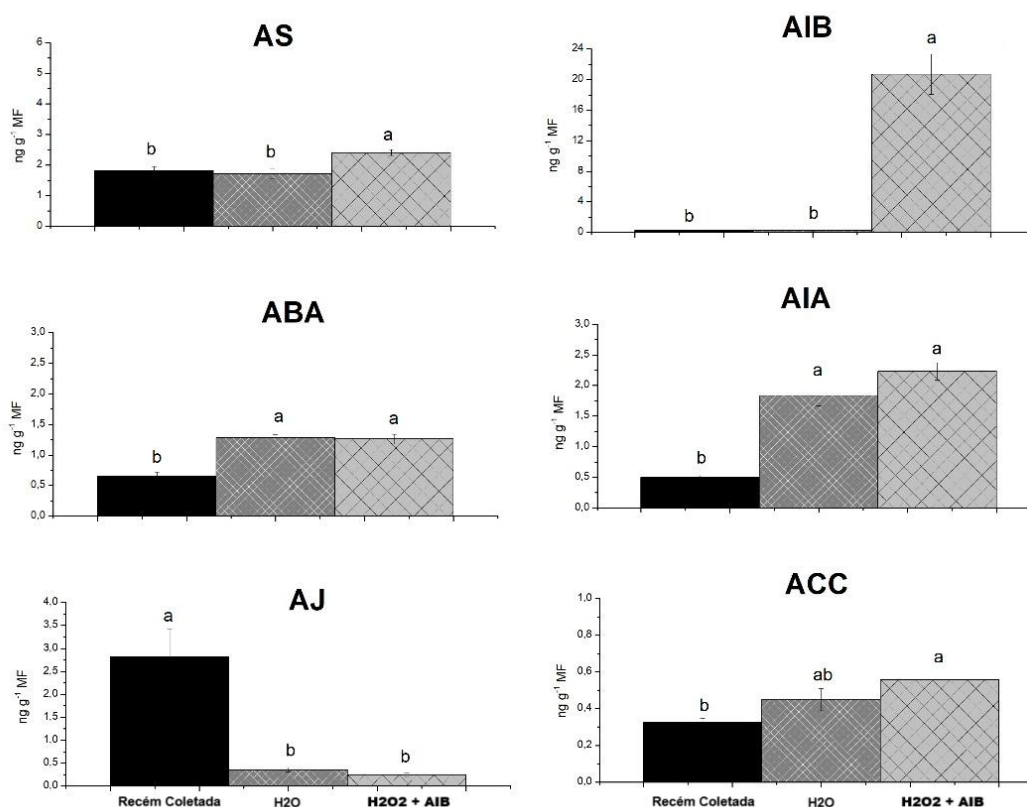


Figura 14. Conteúdo endógeno dos hormônios ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC); ácido indolbutírico (AIB); ácido indolacético (AIA); ácido salicílico (AS); ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (AJ) em miniestacas de *Cordia trichotoma* submetidas a três diferentes condições: (i) imersão em água deionizada por 20h, com aeração forçada nas últimas 12 horas (H₂O), (ii) imersão por 8 horas em 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ seguida de 12 horas em AIB 300 mg L⁻¹ com aeração forçada (H₂O₂+IBA), e (iii) miniestacas recém-coletadas. O conteúdo endógeno dos hormônios foi quantificado em nanogramas de massa fresca (MF). Barras finas representam o erro-padrão da média. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos para cada hormônio, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erros.

O tratamento com H₂O₂ + AIB resultou no acúmulo significativamente maior de AIB, e AS, indicando ativação coordenada destas vias. Esse resultado é contrastado

com o material recém-coletado que apresentou maior acúmulo de AJ e baixos teores de auxinas, refletindo sinalização hormonal associada apenas ao estresse. O grupo tratado apenas com água deionizada não foi estatisticamente diferente dos demais em nenhum dos hormônios avaliados. Essas evidências confirmam o potencial do protocolo combinado de H_2O_2 e AIB em favorecer o enraizamento no momento do estaqueamento. No entanto, esse efeito não foi visto na expedição da câmara de nebulização (Tabela 2), podendo indicar que o material aos dois anos de idade já apresenta recalcitrância que não é superada mesmo na ativação de vias hormonais favoráveis ao enraizamento.

As variáveis sobrevivência aos 180 dias (SOB), enraizamento na expedição da câmara de nebulização (ENR), e emissão de novas brotações aos 180 dias (BROT) foram juntadas aos dados de hormônios (Figura 15) e enzimas (Figura 17) para avaliar como essas variáveis se relacionam entre si e aos tratamentos.

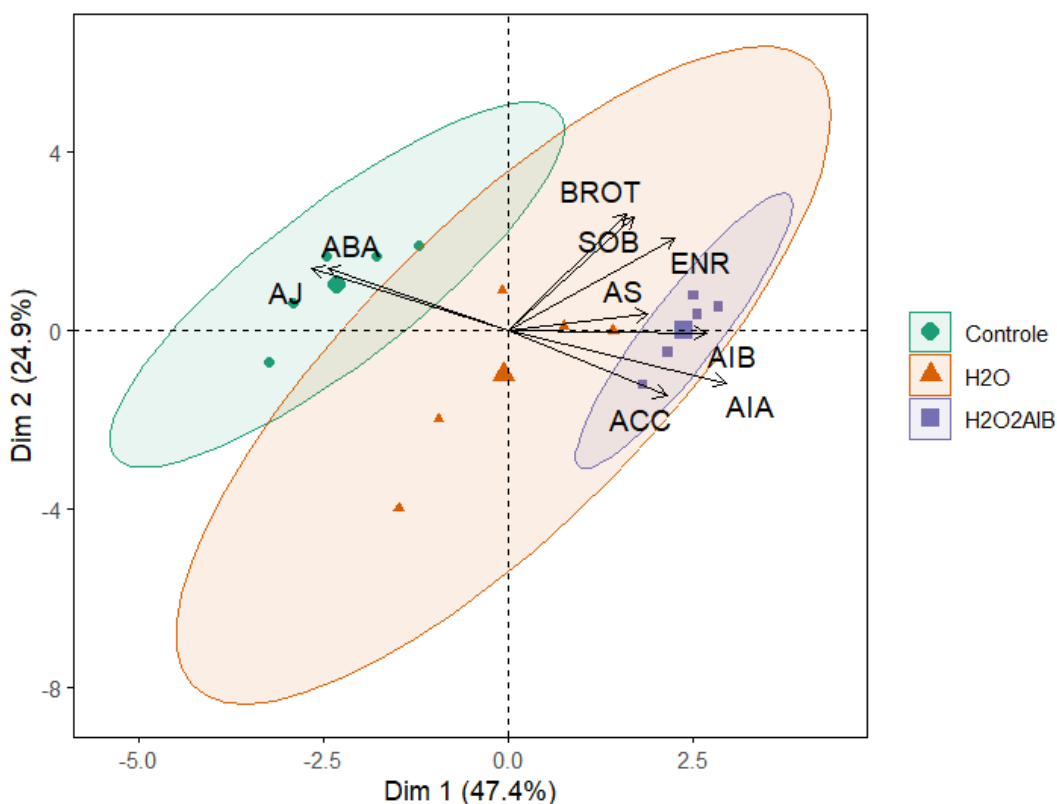


Figura 15. Análise de Componentes Principais baseada no conteúdo endógeno dos hormônios. Análise de Componentes Principais com base no conteúdo endógeno dos hormônios ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC); ácido indolbutírico (AIB); ácido indolacético (AIA); ácido salicílico (AS); ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (AJ) em miniestacas de *Cordia trichotoma* e nas variáveis da etapa de enraizamento sobrevivência total aos 180 dias (SOB); enraizamento ao leve toque aos 60 dias (ENR); emissão de novas brotações aos 180 dias (BROT) de miniestacas de *Cordia trichotoma* submetidas a três diferentes condições: (i) imersão em água deionizada por 20h, com aeração forçada nas últimas 12 horas (H₂O), (ii) imersão por 8h em 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ seguida de 12 horas em AIB 300 mg L⁻¹ com aeração forçada (H₂O₂+IBA), e (iii) miniestacas recém-coletadas. As elipses indicam o agrupamento por tratamento, e os vetores representam a contribuição de cada variável para a variância explicada nas duas primeiras componentes principais (Dim 1 = 47,4%; Dim 2 = 24,9%).

A PCA permitiu separar os três tratamentos testados com base no perfil hormonal e nas respostas morfológicas (Figura 15). O tratamento com H_2O_2 + AIB foi agrupado no quadrante inferior direito, em associação direta com AIA, AIB e ACC e, principalmente, com as variáveis ENR, SOB e BROT. Essa evidência indica que a aplicação combinada induziu o acúmulo de hormônios classicamente associados à rizogênese, o que representa uma resposta hormonal fisiologicamente favorável ao enraizamento.

As variáveis analisadas das miniestacas submetidas ao tratamento com água apresentaram maior dispersão gráfica na PCA. Esse padrão pode estar relacionado ao efeito diluente da imersão prolongada em água deionizada, que, embora não contenha reguladores exógenos, pode ter interferido no balanço hormonal endógeno, resultando em respostas fisiológicas menos consistentes. Por outro lado, o tratamento constituído por miniestacas recém-coletadas (controle), apresentou agrupamento mais coeso, ainda que associado a hormônios inibitórios, como ABA e AJ. Esses resultados complementam o que foi observado nas análises univariadas (Tabela 1), indicando que a sinalização hormonal não foi suficiente para promover ganhos efetivos na rizogênese.

As variáveis obtidas das miniestacas recém-coletadas se concentraram no quadrante superior esquerdo com associação ao ABA e ao AJ. Esse agrupamento sugere que, em propágulos estaqueados sem nenhum tratamento adicional predomina uma sinalização negativa para enraizamento. A distância desses pontos em relação às variáveis morfológicas também sugere baixa capacidade de enraizamento, uma vez que a PCA também representa o quão relacionadas as variáveis estão entre si.

A Figura 16 representa as diferenças significativas encontradas nos níveis hormonais em função dos tratamentos via teste de médias

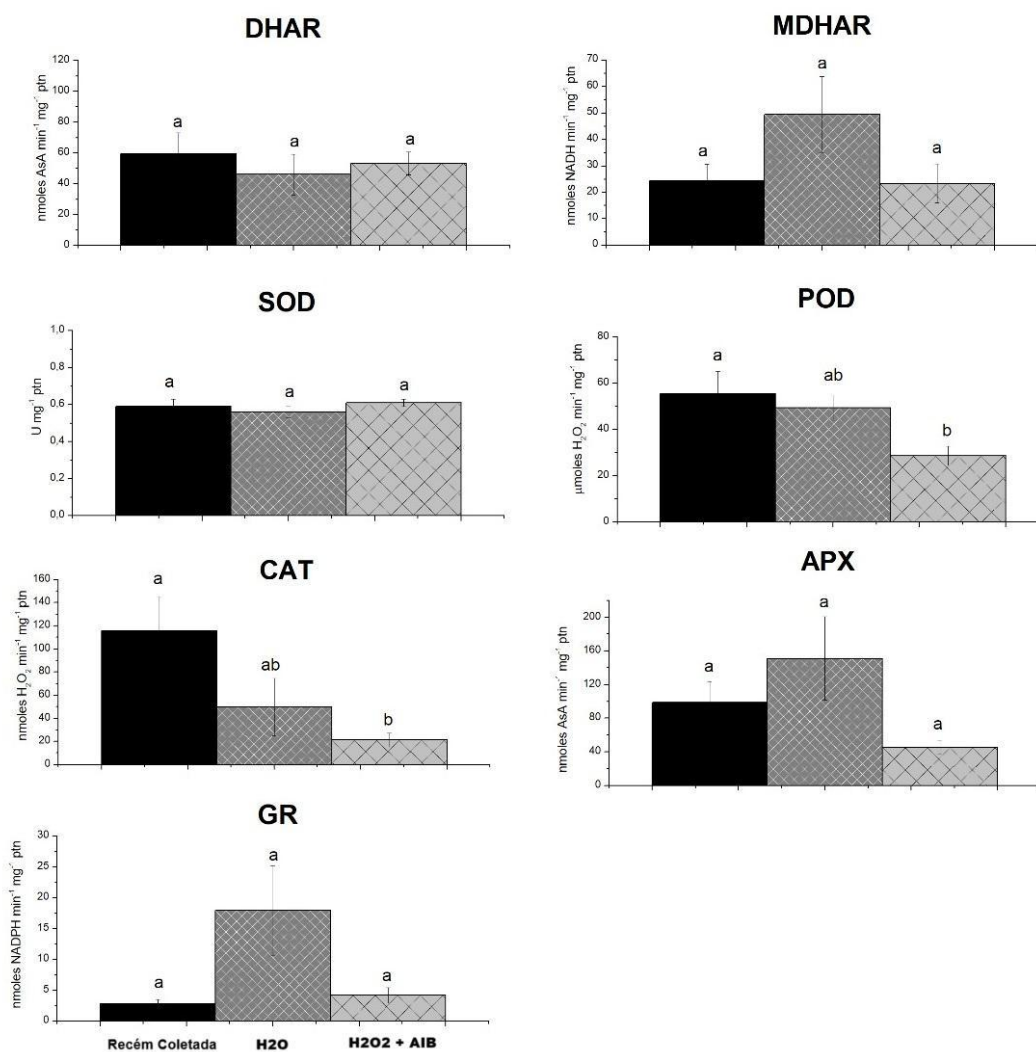


Figura 16. Atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX); catalase (CAT); dehidroascorbato redutase (DHAR); glutathione redutase (GR); monodehidroascorbato redutase (MDHAR); peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em miniestacas de *Cordia trichotoma* submetidas a três diferentes condições: (i) imersão em água deionizada por 20 horas com aeração forçada nas últimas 12 horas (H₂O), (ii) imersão por 8 horas em 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ seguida de 12 horas em AIB 300 mg L⁻¹ com aeração forçada (H₂O₂+ AIB), e (iii) miniestacas recém-coletadas. As atividades enzimáticas foram expressas em unidades específicas por miligrama de proteína, conforme o substrato e reação de cada enzima. Barras finas representam o erro-padrão da média. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos para cada enzima, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Embora existam variações consideráveis nas médias entre tratamentos, não foram detectadas diferenças estatísticas para a atividade das enzimas DHAR, MDHAR, SOD, APX e GR. Esses dados sugerem que, mesmo que seja feita uma maior uniformização das miniestacas entre as parcelas no momento da coleta, outros fatores como a alta variabilidade genética e fenotípica entre os indivíduos de *C. trichotoma* (Santos et al., 2021) podem dificultar a ação dos tratamentos.

Em contrapartida, foram observadas diferenças nas atividades de CAT e POD, enzimas com papéis centrais na desintoxicação do H_2O_2 . Nesses casos, muito embora os tratamentos de enraizamento não tenham diferido entre si, a aplicação de $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ por 12 horas seguida de 300 mg L^{-1} de AIB resultou em menores atividades destas enzimas, quando comparada às miniestacas recém-coletadas. Esse achado pode indicar que, sob as condições testadas, a regulação do H_2O_2 ocorreu de forma não enzimática ou que a concentração de H_2O_2 utilizada excedeu a capacidade de resposta, inibindo CAT e POD. Outra possibilidade é que a atividade da SOD, única enzima avaliada cuja atividade resulta na produção de H_2O_2 , tenha gerado acúmulo endógeno ao ponto que a aplicação exógena não promoveu efeitos adicionais significativos.

As mesmas características avaliadas na etapa de enraizamento foram analisadas em conjunto com os dados de enzimas antioxidantes, conforme ilustrado na figura a seguir (Figura 17).

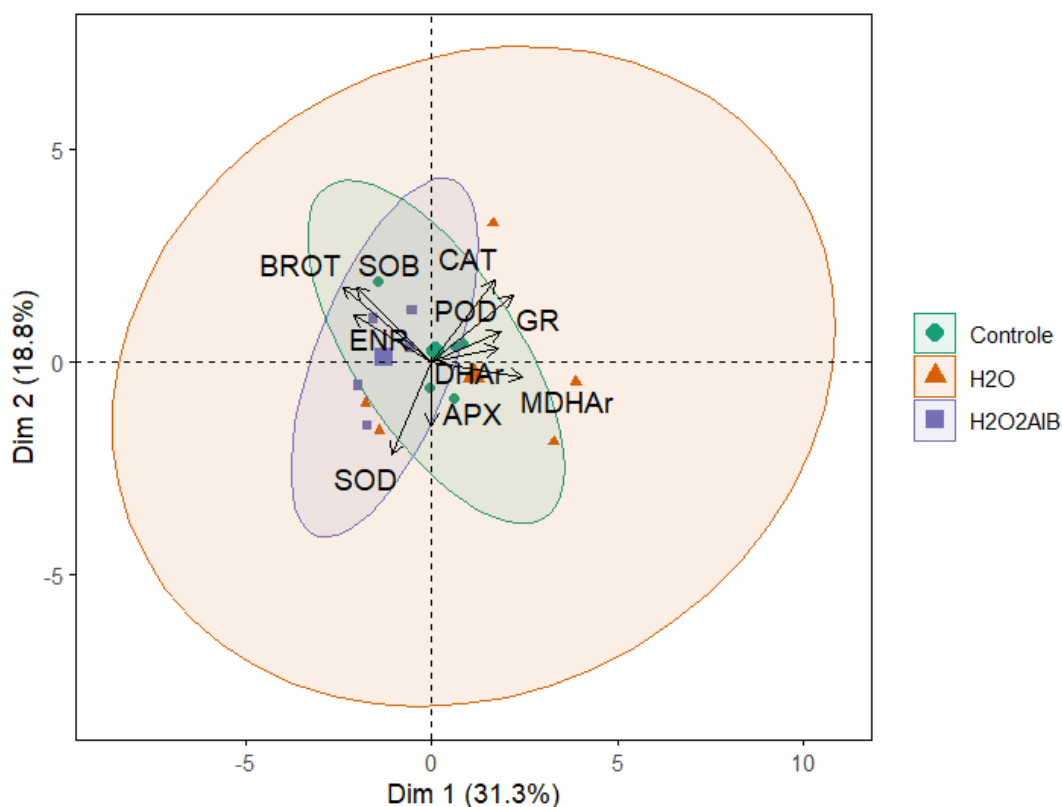


Figura 17. Análise de Componentes Principais baseada nas enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX); catalase (CAT); dehidroascorbato redutase (DHAr); glutatona redutase (GR); monodehidroascorbato redutase (MDHAr); peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em miniestacas de *Cordia trichotoma* e nas variáveis da etapa de enraizamento sobrevivência total aos 180 dias(SOB); enraizamento ao leve toque aos 60 dias(ENR); emissão de novas brotações aos 180 dias (BROT) de miniestacas de *Cordia trichotoma* submetidas a três diferentes condições: (i) imersão em água deionizada por 20h, com aeração forçada nas últimas 12 horas (H₂O), (ii) imersão por 8 horas em 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ seguida de 12 horas em AIB 300 mg L⁻¹ com aeração forçada (H₂O₂+IBA), e (iii) miniestacas recém-coletadas. As elipses indicam o agrupamento por tratamento, e os vetores representam a contribuição de cada variável para a variância explicada nas duas primeiras componentes principais (Dim 1 = 31,3%; Dim 2 =18,8%).

A PCA indicou uma separação parcial entre os tratamentos aplicados às miniestacas de *C. trichotoma*, explicando 50,1% da variância total nos dois primeiros componentes. Embora haja agrupamento, houve sobreposição de tratamentos, o que pode ser atribuído à variabilidade dos dados e ao fato de que parte substancial da variância (cerca de 49,9%) estar distribuída em dimensões não representadas no gráfico. A sobreposição entre os tratamentos Controle e H₂O₂ + AIB, por exemplo, indica que algumas amostras desses grupos compartilham padrões similares de resposta, dificultando uma distinção categórica apenas com base nos dois primeiros componentes principais.

Ainda assim, observam-se padrões relevantes: as variáveis coletadas dos indivíduos submetidos ao tratamento com água tendem a se distribuir de forma mais dispersa, sugerindo menor coordenação bioquímica frente ao estresse ou ausência de estímulo. Em contrapartida, os tratamentos H₂O₂ + AIB e Controle apresentaram distribuição mais concentrada, com pontos próximos aos vetores de enzimas antioxidantes como CAT, POD, GR e APX, bem como às variáveis da etapa de enraizamento SOB, ENR e BROT. Esse agrupamento sugere que, mesmo com sobreposição parcial, esses tratamentos induziram respostas fisiológicas alinhadas com a sobrevivência, enraizamento e emissão de brotações das plantas.

Outro aspecto importante é o posicionamento isolado da enzima SOD, no quadrante inferior esquerdo da PCA. Diferentemente das demais enzimas antioxidantes, que apresentaram comportamento agrupado e correlação positiva entre si, a SOD demonstrou um padrão divergente, que pode ser explicado pela sua função específica de converter o radical superóxido em H₂O₂, que diverge das demais enzimas analisadas. Sob esse aspecto, a limitada separação entre os grupos pode também ser explicada pela complexidade das respostas fisiológicas envolvidas ou até mesmo a ativação de outras rotas metabólicas que não foram objeto deste estudo.

Portanto, os dados reforçam que, embora o tratamento com H₂O₂ + AIB tenha favorecido o agrupamento de variáveis antioxidantes na PCA, esse padrão não se refletiu com clareza em todas as variáveis. Essa resposta evidencia que análises complementares como a quantificação direta de H₂O₂ nas miniestacas de *C. tritotoma*, ou ainda acompanhamento da atividade das enzimas antioxidantes nas diferentes etapas do enraizamento poderão rastrear o efeito bioquímico do protocolo desenvolvido por (Silva et al., 2022).

DISCUSSÃO

Experimento 1: Miniestaquia de dois materiais de origem seminal e diferentes graus de maturação de *C. trichotoma*

A comparação entre sobrevivência de miniestacas de *C. trichotoma* com diferentes idades (Figura 5), permitiu estabelecer que materiais mais velhos, ainda que juvenis, apresentam maior mortalidade. A taxa de perdas de parcelas no material de cinco anos foi elevada (27,5%), comprometendo as análises estatísticas para as demais variáveis. A mesma dificuldade foi percebida em outros ensaios anteriores do grupo, principalmente para materiais mais maduros, com destaque para tentativa de enraizamento de miniestacas oriundas de material clonal (Silva et al., 2021). Dessa forma, os dados obtidos indicam que os limites fisiológicos do material propagativo têm papel mais determinante do que a presença de indutores exógenos. Apesar disso, na literatura também foram relatados maiores valores de sobrevivência e enraizamento de miniestacas oriundas de minicepas clonais em comparação àquelas obtidas de minicepas seminais com um ano de idade, como evidenciado por Kielse et al. (2015), sugerindo que a elevada variabilidade genética (Santos et al., 2021) e a procedência do material também podem interferir nos protocolos de propagação.

Houve efeito das concentrações de AIB sobre o enraizamento (Figura 6), com melhor resposta na concentração de 4000 mg L⁻¹. Faganello et al. (2015) relataram aumento no enraizamento de estacas semilenhosas de *C. trichotoma* com AIB, onde 8000 mg L⁻¹ aplicado por 10 segundos na base das estacas, resultaram em 28,9 % de enraizamento e aumento do número de raízes. No entanto, os autores também observaram que o aumento das concentrações de AIB (0, 2000, 4000, 6000 e 8000 mg. L⁻¹) apresentou correlação positiva com o aumento da mortalidade das estacas, gerando perdas de até 32,3% na maior concentração testada. Dessa forma, ao mesmo tempo em que houve efeito promotor do enraizamento houve efeito nocivo à sobrevivência com o aumento das concentrações de AIB. Esses resultados reforçam que a eficácia do AIB depende de compatibilidade entre concentração, tempo de exposição e estado fisiológico do tecido.

Ainda sobre as características de raízes, Avinio et al. (2022) verificaram aumento do enraizamento de miniestacas de *C. trichotoma* com a base imersa em 10 segundos em solução de AIB a 3000 mg.L⁻¹. Apesar de afetar o enraizamento, o AIB não afetou o número e comprimento de raízes obtidos para as concentrações testadas. No presente estudo, embora o AIB tenha promovido efeito significativo sobre o percentual de enraizamento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas variáveis morfológicas associadas ao sistema radicular, como NRPO, CTRPO, MSSR e IQD, indicando que os tratamentos empregados foram insuficientes para modular tais características (Tabela 1).

Embora o H₂O₂ seja reconhecido como molécula sinalizadora envolvida na diferenciação celular e na ativação de respostas antioxidantes (Neill et al., 2002; García-Mata e Lamattina, 2020), sua eficácia pode ser limitada pela idade do propágulo. No trabalho de Silva et al. (2022), por exemplo, o uso de 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ promoveu enraizamento superior a 90% em miniestacas juvenis de *C. trichotoma*, tal experimento foi conduzido em propágulos de minicepas com menos de um ano de idade e em combinação com AIB a 300 mg L⁻¹ (com imersão da base por 12 horas). No presente estudo, por outro lado, o material utilizado provinha de minicepas com dois anos de idade e foi submetido a concentrações mais elevadas de AIB, em imersão por período mais curto, com o objetivo de reduzir a duração do tratamento. Essa diferença metodológica não resultou em efeito do H₂O₂, uma vez que sua ação depende não apenas da presença, mas também da integração com rotas hormonais ativas e da sensibilidade oxidativa do tecido, que são fatores modulados pela idade da planta matriz (Hartmann et al., 2011).

Além do mais, estudos como os de Kielse et al. (2013) e Bisognin et al. (2020) mostraram que a resposta ao AIB varia conforme o tipo de estaca (caulinar ou radicular), a posição da gema e a origem do material (juvenil ou adulto). Assim, é possível que o material com dois anos de idade, embora jovem, já apresente algum grau de recalcitrância ao enraizamento.

Outro aspecto a ser considerado é a resposta integrada das variáveis morfológicas. Enquanto o enraizamento depende diretamente da capacidade rizogênica, características como altura e MSPA estão ligadas à qualidade morfológica e à robustez das mudas, influenciando diretamente o sucesso de campo. A altura das mudas foi positivamente influenciada pela aplicação de AIB (Figura 7), com ganhos

na concentração de 4000 mg L⁻¹ que resultou em média superior a 14 cm. Esse valor representa aumento de cerca de 100% em relação ao controle, o que reforça a relevância da auxina no crescimento vegetativo inicial, fase crítica para o estabelecimento de mudas à campo. Ainda sobre a aplicação de 4000 mg L⁻¹ de AIB, houve efeito positivo sobre MSPA que registrou o triplo de biomassa em relação ao grupo controle. Em estudos anteriores, como o de Avinio et al. (2022), esse acúmulo foi associado ao tempo de cultivo e tipo de substrato utilizado, os resultados obtidos neste experimento apontam a aplicação de auxina como o principal fator determinante para o incremento da parte aérea, indicando uma resposta coordenada entre a emissão de raízes adventícias e o desenvolvimento vegetativo das mudas de *C. trichotoma*.

Por outro lado, no caso do diâmetro do caule, as concentrações de AIB testadas não promoveram incrementos significativos. Neste parâmetro, os ganhos relatados por Avinio et al. (2022) foram atribuídos ao tempo de cultivo e ao uso de substrato misto com vermiculita, reforçando que o diâmetro tende a ser mais influenciado por condições físicas e tempo de desenvolvimento do que pela aplicação de reguladores exógenos.

Observa-se assim, que a combinação entre H₂O₂ e AIB não potencializou formação de raízes adventícias em miniestacas de *C. trichotoma*, independentemente da idade das plantas matrizes. Embora tenha sido observada efeito positivo do AIB sobre o enraizamento e o crescimento vegetativo de miniestacas oriundas de minicepas com dois anos de idade, não houve efeito significativo do H₂O₂ ou interação entre H₂O₂ e AIB sobre as variáveis avaliadas. Além disso, o elevado índice de mortalidade no material com cinco anos inviabilizou as análises morfológicas para esse grupo, evidenciando que o avanço ontogenético limita substancialmente a capacidade de regeneração vegetativa da espécie, mesmo na presença de estímulos exógenos utilizados. Assim, o estudo confirma a eficiência do AIB em promover a rizogênese e o crescimento de miniestacas juvenis, mas também evidencia que a superação das restrições fisiológicas impostas pela maturação ainda representa um desafio para a clonagem de genótipos superiores de *C. trichotoma*. Estudos que investiguem mapeamento hormonal e bioquímico podem ser alternativas para ampliar a resposta em materiais em idade mais avançada.

Dessa forma, os resultados aqui apresentados reforçam a importância de protocolos específicos e adaptativos para a silvicultura clonal de *C. trichotoma*, uma vez que tanto o desempenho morfológico quanto o sucesso rizogênico estão condicionados à interação complexa entre fatores exógenos e endógenos, cuja compreensão plena exige o uso integrado de ferramentas fisiológicas e bioquímicas.

Experimento 2: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes em materiais de diferentes graus de maturação de *C. trichotoma*

Os resultados apresentados mostram que o estado de maturação e a origem do material influenciam no conteúdo hormonal e na atividade de enzimas antioxidantes em miniestacas de *C. trichotoma*. A análise hormonal mostrou padrões de acúmulo distintos entre os diferentes tratamentos, com miniestacas provenientes de minicepas com dois anos apresentando associação ao AJ e ao ABA, hormônios relacionados com processos de defesa e desenvolvimento vegetal (Devi et al., 2024). A proximidade entre esses reguladores sugere que, mesmo em tecidos juvenis, vias de sinalização de defesa podem estar ativas, modulando negativamente a indução de raízes. O acúmulo de AS e o precursor do etileno, ACC, no grupo oriundo de resgate vegetativo de plantas adultas está associado a vias de estresse e senescência, o que se relaciona ao menor desempenho no enraizamento observado para materiais mais maduros (Silva et al., 2021). O baixo nível de AIA no material oriundo de resgate vegetativo sugere que a limitação ao enraizamento pode estar ligada à redução de auxina endógena.

Com relação a função de AIA na rizogênese adventícia, Ahkami et al. (2013) demonstraram que o sucesso do enraizamento em estacas de *Petunia hybrida* depende de um pico precoce de AIA na base das estacas que, por sua vez, induz os eventos celulares iniciais e direciona a energia necessária ao processo. De forma semelhante, Rasmussen et al. (2015), estudando a influência da mudança do estado de desenvolvimento (de vegetativo para reprodutivo) sobre o enraizamento de estacas de *Pisum sativum*, observaram que a aplicação exógena de AIA e AJ promove o enraizamento apenas em estacas vegetativas, sendo ineficaz em tecidos maduros.

Esse resultado indica que há um estado fisiológico, relacionado à idade do tecido, que não pode ser superado apenas pela aplicação de indutores de enraizamento.

No presente estudo, a direção dos vetores de AIA e as miniestacas provenientes de minicepas com dois anos em orientação oposta aos vetores de ACC e AS na PCA hormonal (Figura 11), reforça a discussão sobre a dependência do estado fisiológico do tecido na diferenciação de raízes. Com base nos resultados, é possível inferir que o enraizamento adventício depende não apenas da presença de auxinas, mas também da supressão de vias hormonais associadas a inibidores do crescimento como ABA e AJ. A sobreposição parcial dos agrupamentos nas PCAs com os hormônios e com enzimas antioxidantes (Figuras 11 e 13) indica que a maturação fisiológica influencia de forma integrada a regulação hormonal e o sistema antioxidante, influenciando diretamente na competência rizogênica.

Com relação à atividade enzimática e à idade fisiológica dos materiais (Figura 4), observou-se que a enzima SOD apresentou níveis similares entre as miniestacas oriundas de minicepas com cinco anos de cultivo e aquelas provenientes de resgate vegetativo de plantas adultas. No entanto, houve aumento da atividade de SOD no material seminal de minicepas com cinco anos em relação às minicepas de dois anos. Esse padrão sugere que, à medida que o tecido se torna mais maduro, há uma maior tendência à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), particularmente o radical superóxido (O_2^-), cuja dismutação é catalisada pela superóxido dismutase (SOD). As ROS são produzidas majoritariamente nas mitocôndrias durante o processo respiratório, o que estabelece uma conexão entre a geração de energia celular e a regulação do estresse oxidativo ao longo da rizogênese (Gupta et al., 2016), assim como nos peroxissomos e nos cloroplastos, principalmente durante a atividade fotossintética e a fotorrespiração em tecidos foliares.

Ao contrário do proposto por Ahkami et al. (2013), que apontam o pico inicial de AIA como determinante para a distribuição de energia necessária para a ativação celular na base das estacas, aparentemente, a maior concentração de AIA no material de cinco anos (Figura 11) não foi suficiente para estimular outras enzimas como CAT e POD, que são mais frequentemente associadas ao enraizamento. Esse achado é consistente com estudos que demonstram uma queda acentuada na capacidade de enraizamento adventício em materiais de *C. trichotoma* com mais de três anos de

idade fisiológica, mesmo diante de estímulos hormonais exógenos (Bisognin et al., 2020; Silva et al., 2021).

A atividade da enzima SOD pode ser regulada por ABA e AIA, desempenhando papel fundamental na tolerância ao estresse oxidativo e na decomposição do H₂O₂ (Pan et al., 2019). No presente estudo, embora o conteúdo de ABA tenha sido reduzido com o envelhecimento do material, observou-se um aumento nos níveis de AIA em miniestacas oriundas de minicepas com cinco anos. Este acúmulo hormonal coincidiu com o aumento da atividade de SOD, sugerindo que nesse material de *C. trichotoma* o AIA module positivamente a atividade de SOD. No entanto, estudos recentes como o de Lee et al. (2024) indicam que a ativação da via da auxina pode ocorrer por supressão de sinais de AJ. Essa relação foi reforçada tanto pelos dados obtidos neste estudo quanto pelos obtidos por Oliveira et al. (2022) em *Cedrela fissilis*, onde foi observado que em subcultivos sucessivos houve queda do enraizamento, acompanhada da queda nos níveis de AIA e ABA em contraste do aumento de AJ e AS. Essa evidência reforça a necessidade de tratamentos exógenos capazes de superar o declínio na capacidade rizogênica causada pela maturidade.

Luo et al. (2024) ao estudarem *Cinnamomum parthenoxylon*, relataram que genes relacionados à formação de raízes adventícias são regulados por AIA, AJ e AS. No presente estudo, as análises de componentes principais mostraram que as miniestacas provenientes de minicepas com dois anos se associaram ao ABA e ao AJ, enquanto o material de cinco anos apresentou maior proximidade ao vetor de AIA, o que posteriormente também foi confirmado no teste de médias. Já o grupo resgatado apresentou clara associação aos vetores de ACC, precursor do etileno, e ao AS, hormônios tipicamente relacionados ao estresse e à senescência.

Essa distribuição sugere que apenas o grupo proveniente de minicepas com dois anos de idade apresenta sinais integrados de resposta ao estresse e ausência de acúmulo de inibidores como ACC e AS. Esse equilíbrio é compatível com um ambiente fisiológico favorável à indução radicular, tal como descrito por Luo et al. (2024), em que a combinação de auxinas com reguladores de defesa controla a ativação da rizogênese. Em contraste, os demais grupos apresentaram perfis parciais ou desbalanceados: o material de cinco anos acumulou AIA, mas sem suporte de outros reguladores necessários e o material resgatado acumulou ACC e AS, o que

indica um contexto hormonal mais relacionado à defesa e senescência do que à regeneração.

Em diversos momentos do trabalho, a interpretação das PCAs evidenciou padrões de variação entre os grupos, que não foram detectados pelos testes de média. Por exemplo, nos dados hormonais, a PCA separou os materiais com base na associação entre auxinas e etileno (Figura 11), conforme comentado anteriormente, mesmo quando algumas dessas variáveis não apresentaram diferenças significativas isoladamente (Figura 10). Situação semelhante foi observada na PCA de enzimas antioxidantes, em que o agrupamento de miniestacas provenientes de minicepas com dois anos de idade ao lado de POD, CAT e APX, conforme com base na literatura era esperado para materiais com maior capacidade de enraizamento, ainda que não tenham sido encontradas diferenças para essas enzimas entre materiais (Figura 12). Esses resultados reforçam que o uso de análises multivariadas, como a PCA, permite mostrar relações complexas entre variáveis que atuam de forma integrada no sistema biológico, oferecendo uma visão mais ampla e sensível dos efeitos da idade fisiológica das minicepas.

Diante desse contexto, em que o envelhecimento do material compromete o equilíbrio hormonal e a regulação bioquímica necessária à rizogênese, torna-se necessário discutir estratégias para mitigar os efeitos da maturação. Uma das alternativas poderá ser a miniestaquia seriada, que visa recuperar o vigor vegetativo de materiais mais maduros já resgatados (Wendling et al., 2014), ou ainda a coleta contínua de galhos de copa, com o objetivo de induzir brotações epicórmicas (Xavier et al., 2009). No entanto, ambas as abordagens apresentam limitações significativas. A baixa competência rizogênica de materiais adultos de *C. trichotoma*, com taxas de enraizamento em torno de 10% (Silva et al., 2021), compromete a multiplicação via miniestaquia seriada de propágulos viáveis nas fases iniciais do processo, dificultando sua aplicação em escala comercial.

Por outro lado, Nunes et al (2024), estudando a seleção precoce de indivíduos superiores de *C. trichotoma* em teste de progênie, concluíram que aos 3 anos de idade é possível selecionar precocemente, com 70% de chances de acerto, indivíduos superiores. Esse marco etário representa uma janela promissora para coleta de galhos visando à indução de brotações epicórmicas e posterior formação de matrizeiros. A partir desses indivíduos resgatados, pode-se empregar o método

proposto por Avinio et al. (2023), que recomenda o uso do número de miniestacas enraizadas e do diâmetro do caule das mudas de *C. trichotoma* como critérios eficazes para a seleção de clones superiores com maior aptidão à propagação vegetativa. Essa abordagem integrada otimiza os ganhos genéticos e operacionais ao combinar seleção precoce e revigoração dos materiais. Ademais, nesse momento de maior vigor dos genótipos superiores, podem ser testados outros agentes antioxidantes como carvão ativado, ácido ascórbico, óxido nítrico, visando modular o estresse oxidativo e por consequência melhorar a eficiência rizogênica.

Experimento 3: Níveis hormonais e atividade de enzimas antioxidantes sob efeito de tratamentos de enraizamento

Li et al. (2009) demonstraram que o H_2O_2 atua como sinalizador chave na formação de raízes adventícias, sendo seu efeito neutralizado na presença de catalase, o que evidencia a necessidade de uma regulação redox fina para que o enraizamento ocorra. No presente estudo, a combinação de H_2O_2 e AIB resultou em maior ativação de enzimas antioxidantes (Figura 7), sugerindo uma interação positiva entre estímulo ao enraizamento e ativação das vias de detoxificação. No entanto, os agrupamentos da PCA mostraram a SOD como principal vetor associada às miniestacas sem tratamento de enraizamento, sem correlação expressiva com CAT e POD, indicando uma ativação redox incompleta e possivelmente insuficiente para sustentar a sequência bioquímica da rizogênese. Essa limitação foi sustentada pelo teste de médias (Figura 16), que mostrou redução na atividade de CAT e POD no tratamento com de H_2O_2 e AIB, enzimas essenciais na neutralização do H_2O_2 .

A elevação de SOD sugere detoxificação do radical superóxido (O_2^-), com consequente acúmulo de H_2O_2 . Esse acúmulo potencial de H_2O_2 pode ter desencadeado o aumento compensatório nas atividades de POD e CAT nas miniestacas que não receberam tratamento de enraizamento, sugerindo uma resposta ao estresse oxidativo excessivo (Figura 16). Em contraste, Li et al. (2009) relataram que a aplicação de H_2O_2 em plântulas de *Vigna radiata* promoveu o enraizamento adventício, evidenciando que os efeitos do H_2O_2 podem ser espécie dependente, uma

vez que não foi observado aumento do enraizamento no estudo desenvolvido com *Amburana cearensis* utilizando H_2O_2 (Silva, 2022).

Essa diferença de resposta pode explicar por que, no presente estudo, o protocolo proposto por Silva et al. (2022), baseado na aplicação combinada de H_2O_2 e AIB, não resultou em aumento significativo nas taxas de enraizamento, apesar de ativar vias bioquímicas semelhantes. A idade dos materiais também pode ter afetado a resposta, uma vez que Silva et al. (2022) utilizaram materiais com menos de um ano de idade. Neste experimento, mesmo as miniestacas de dois anos de idade apresentaram sinais de recalcitrância ao enraizamento (Tabela 2). Assim, os resultados sugerem que, embora o uso de H_2O_2 e AIB induzam vias antioxidantes relevantes, a eficiência da rizogênese depende da sincronização entre fatores hormonais, oxidativos e ontogenéticos, cuja interação precisa ser mais bem compreendida em estudos futuros.

Há ainda outras razões para inativação de enzimas. A baixa atividade das enzimas CAT e POD observada no presente estudo, mesmo diante da maior atividade de SOD, não pode ser atribuída unicamente à ausência de substrato, uma vez que o conteúdo de H_2O_2 nos tecidos não foi mensurado. Diversos mecanismos podem explicar essa inatividade como a inibição mediada por hormônios como ABA, modificações oxidativas diretas nas proteínas enzimáticas por excesso de ROS, alterações no microambiente celular (como pH e disponibilidade de cofatores), ou ainda a compartimentalização do H_2O_2 (Desikan et al., 2001; Murata et al., 2001; Zhang et al., 2001; Baxter- Burrell et al., 2002; Bolwell et al., 2002). Além disso, outras moléculas antioxidantes como o ácido ascórbico podem reduzir diretamente, de forma não enzimática, o H_2O_2 (Noctor e Foyer, 1998), ainda que de forma limitada. Esses achados ressaltam a necessidade de conduzir análises complementares que incluam quantificação direta de H_2O_2 , e avaliação do conteúdo interno de antioxidantes não enzimáticos, como ácido ascórbico. Tais análises poderiam auxiliar na escolha de outros agentes antioxidantes como estimuladores ao enraizamento.

Conforme se observa na PCA (Figura 15), o tratamento com H_2O_2 + AIB foi associado não apenas às características avaliadas na etapa de enraizamento, mas também aos hormônios AIA, AIB e o precursor do etileno, ACC, confirmando o estímulo à produção de auxinas e do ACC na presença destes agentes. Essa interação entre AIA e ACC já foi descrita por Steffens e Rasmussen (2016), que

sugerem que o etileno atua sinergicamente com as auxinas durante os primeiros estágios do enraizamento, estimulando a desdiferenciação celular. No entanto, a ação do etileno é altamente dependente do equilíbrio hormonal, já que concentrações elevadas de ABA e AJ podem inibir o processo de enraizamento.

Por conseguinte, o conteúdo endógeno de AIA pode variar significativamente em função do local de produção e do tempo decorrido após a coleta das estacas. Ahkami et al. (2013), ao monitorarem o conteúdo endógeno desse hormônio em estacas de *Petunia hybrida*, relataram um aumento tardio de AIA na folha mais baixa (entre 72 e 192 horas após a excisão), enquanto o pico na produção de AIA na base da estaca foi precoce, ocorrendo nas primeiras 24 horas. Paralelamente, esses autores observaram alterações na atividade das enzimas invertases da parede celular, citosólica e vacuolar, além da glicose-6-fosfato desidrogenase (Glc6PDH), que se correlacionaram positivamente com a disponibilidade de glicose, frutose, sacarose e açúcares solúveis, na base das estacas.

Em algumas espécies, como o crisântemo, já foi estabelecido que a maior capacidade de enraizamento está associada às maiores razões sacarose/amido nas folhas no momento da coleta das estacas (Druege et al., 2000), refletindo disponibilização de assimilados ao processo de formação de novas raízes. No contexto do presente trabalho, que avaliou os efeitos do H₂O₂ e do AIB sobre o enraizamento de miniestacas de *C. trichotoma*, esses achados indicam que avaliações complementares, como a quantificação temporal de açúcares solúveis e a atividade enzimática relacionada ao metabolismo energético, poderiam esclarecer se a recalcitrância ao enraizamento ocorre em razão, ou não, da disponibilidade de energia na base das miniestacas.

Chen et al. (2023), trabalhando com a aplicação de 800 mg L⁻¹ de ácido indeno naftalenoacético para o enraizamento de estacas de amoreira (*Morus alba*), observaram que houve pico inicial da atividade da enzima POD, seguido por queda durante a indução do enraizamento. Além disso, os autores relataram que a razão AIA/ABA foi caracterizada por um declínio inicial seguido de estabilização, sugerindo que o equilíbrio entre esses hormônios é favorável apenas nos estágios iniciais da indução de raízes adventícias. No presente trabalho, no momento do estaqueamento, observou-se menor atividade da POD e um aumento nas concentrações de AIA no

protocolo de enraizamento proposto por Silva et al. (2022), que pode ter sido influenciada por uma possível conversão do AIB em AIA (Strader et al.,2010).

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo destacam a influência da idade no enraizamento de *C. trichotoma*, evidenciando que, ainda que na fase juvenil, o aumento da idade das minicepas reduz a capacidade de enraizamento de miniestacas. O AIB na concentração de 4000 mg L⁻¹ aumentou o enraizamento de miniestacas e o crescimento de mudas oriundas de matrizes com dois anos de idade. Não houve efeito do H₂O₂ ou de sua interação com AIB sobre as variáveis avaliadas. A respeito da investigação bioquímica dos materiais e dos métodos de enraizamento, foi observado que o protocolo promoveu acúmulo de auxinas e ACC, suprimiu sinalizadores inibitórios (AJ e ABA) e ativou o sistema antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahkami, A.H., Melze,r M., Ghaffari, M.R., Pollmann, S., Ghorbani-Javid M., Shahinnia F., Hajirezaei M.R., Druege U. (2013) Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta*, 238(3):499-517. DOI: 10.1007/S00425-013-1907-Z.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53 (372): 1331-41.
- Arrigoni, O., Dipierro, S., Borracino, G. (1981) Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Letters*, 125: 242–245.
- Avinio, R.S., Malheiros, A.C.,Gazzana, D., Lencina, K.H., Tonetto, T.S., Bisognin, D.A. (2023) Selection of *Cordia trichotoma* Vell. clones for adventitious rooting and determination of the plantlet quality produced by mini-cuttings. *Ciência e Natura*, 45:1-17. DOI: 10.5902/2179460X66903.
- Avinio, R.S., Malheiros, A.C., Maculan, L.G., Gazzana, D., Lencina, K.H., Tonetto, T.S.; Bisognin, D. A. (2022) Rooting of mini-cuttings and quality of plantlets of *Cordia trichotoma*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*,57:1-10. DOI: 10.1590/S1678-3921.
- Barroso, D.G., de Oliveira, T.P.F., Siqueira, D.P., Lamônica, K.R., Carvalho, G.C.M.W. (2018a) Mini-stumps productivity and rooting of *Khaya ivorensis* A. Chev mini-cuttings treated with IBA.*Cerne*,24(2):114-120. DOI: 10.1590/01047760201824022536.
- Barroso, D.G., Souza, M.G.O.S., Oliveira, T.P.F., Siqueira, D.P. (2018b) Growth of Atlantic Forest trees and their influence on topsoil fertility in the Southeastern Brazil. *Cerne*,24(4):352-359. DOI: 10.1590/01047760201824042605.

Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M., Zolman, B.K. (2001) Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20:198-216. DOI: 10.1007/s003440010026.

Baxter-Burrell, A., Yang, Z., Springer, P.S., Bailey-Serres, J. (2002) RopGAP4-dependent Rho GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science*, 296: 2026-2028.

Bhattacharjee, S. (2012) The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany*, 1: 1–22.

Bisognin, D.A., Kielse, P., Lencina, K.H., de Mello, U.S. (2020) Vegetative propagation of *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. by cuttings from shoots and roots. *Cerne*, 26(2) 265-271. DOI: 10.1590/01047760202026022732.

Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1367-1376.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(2):248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Carvalho, G.C.M.W., Siqueira, D.P., Silva, R.D., Silva, M.K.F., Barroso, D.G. (2021) Mini-cutting of *Plathymenia reticulata* Benth. with ministumps conducted in suspended seedbed and tubes. *Cerne*, 27:1-9. DOI: 10.1590/01047760202127012584.

Carvalho, P.E.R (2002) Espécies arbóreas brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa Florestas. 1ª edição, p. 1039.

Carvalho, P.E.R. (2003a) Espécies arbóreas brasileiras. Embrapa Florestas. 2ª edição, p. 1044.

Carvalho, P.E.R. (2003b) Espécies arbóreas nativas: silvicultura e usos. Anais do Congresso I Semana do Estudante Universitário – Meio Ambiente, Colombo: Embrapa florestas, v.1, p. 88.

Chen, H., Lei, Y., Sun, J., Ma, M., Deng, P., Quan, J., Bi, H. (2023) Effects of Different Growth Hormones on Rooting and Endogenous Hormone Content of Two *Morus alba* L. Cuttings. *Horticulturae*,9:552-570. DOI: 10.3390/horticulturae9050552.

Cho, H.Y., Chang, C.Y., Huang, L.C., Tsai, J.B., Liu, Z.H. (2011) Indole-3-butyric acid suppresses the activity of peroxidase while inducing adventitious roots in *Cinnamomum kanehirae*. *Botanical Studies*, 52: 153–160.

De Deus, R.D., Siqueira, D.P., Carvalho, G.C.M.W., Silva, M.K.F., Barroso, D.G. (2021) Vegetative rescue of *Paratecoma peroba* adult trees: Adventitious rooting of epicormic sprouts from detached branches. *Rhizosphere*,19:100419. DOI: 10.1016/j.rhisph.2021.100419.

De Mendiburu, F. (2019) *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.3-1, 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>. Acessado em 28/09/2025.

Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K., Neill, S.J. (2001) Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiology*, 126: 1579-1587.

Devi, A.M, Johar, V., Bisht, V., Singh, V. (2024) Harnessing nature's signal: The transformative role of jasmonic acid in plant defense and development. *Plant Archives*,24(2):2601-2612. DOI: 10.51470/PLANTARCHIVES.2024.v24.no.2.372.

Dickson, A., Leaf, A.L., Hosner, J.F. (1960) Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *Forestry Chronicle*, 36: 10–13.

Druege, U., Franken, P., Hajirezaei, M.R. (2016) Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 7:381. DOI: 10.3389/fpls.2016.00381.

Druege, U., Zerche, S., Kadner, R., Ernst, M. (2000) Relation between nitrogen status, carbohydrate distribution and subsequent rooting of *Chrysanthemum* cuttings as affected by pre-harvest nitrogen supply and cold-storage. *Annals of Botany*, 85: 687–701.

Faganello, L.R., Dranski, J.A.L., Malavasi, U.C., Malavasi, M.M. (2015) Efeito dos ácidos indolbutírico e naftalenoacético no enraizamento de estacas semilenhosas de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. *Ciência Florestal*, 4: 863–871.

Felippi, M., Maffra, C.R.B., Cantarelli, E.B., Araújo, M.M., Longhi, S.J. (2012) Fenologia, morfologia e análise de sementes de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. *Ciência Florestal*, 22(3): 631-641.

Fick, T.A. (2007). Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Santa Maria – RS, Universidade Federal de Santa Maria, 63p.

Freitas, M.L.M., Sebbenn, A.M., Moraes, E., Zanatto, A.C.S., Verardi, C.K., Pinheiro, A.N. (2006) Parâmetros genéticos em progênies de polinização aberta de *Cordia trichotoma* (Vell.) ex Steud. *Revista do Instituto Florestal*, 18: 95-102.

García-Mata, C., Lamattina, L. (2020) Hydrogen peroxide as a key player in plant hormone signaling networks. *Trends in Plant Science*, 25(10): 979-992.

Giannopolis, P., Reis, J. (1977) Superóxido dismutase: metodologia para determinação em extratos vegetais. *Revista de Ciência e Tecnologia*, 2: 56-61.

Gibson, E.L., Gonçalves, E.O., Santos, A.R., Araújo, E.F., Wendling, I., Alexandre RS, Caldeira MVW (2021) Responsiveness of *Melanoxylon brauna* to mini-cuttings technique. *Rhizosphere*, 17:100303. DOI: 10.1016/j.rhizo.2021.100303.

Gill, S.S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.

Gupta, D.K., Palma, J.M., Corpas, F.J. (2016) Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses. Springer International Publishing, Switzerland. 1ª edição, p.289.

Gutierrez, L., Mongelard, G., Floková, K., Pacurar, D.I., Novák, O., Staswick. P., Bellini, C. (2012) Auxin controls *Arabidopsis* adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *The Plant Cell*, 24(6): 2515-2527.

Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., Geneve, R.L. (2011) Plant Propagation: Principles and Practices. 8ª edição. Boston: Prentice Hall, 8ª edição, p. 313-483.

Havir, E.A., Mchale, N.A. (1987) Catalase isozyme and heat stability in leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant maize. *Plant Physiology*, 83: 219-223.

Hayat, G., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1):14-25.

Hilger, H.H., Zippel, E. (2001) Studies in the Boraginaceae: An index to the publications of Ivan M. Johnston dealing with the Borage family. *Haussknechtia Beiheft*, 11: 1-151.

Kar, M., Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57: 315-319.

Kielse, P., Wille, L.F., Bisognin, D.A. (2013) Propagação vegetativa de *Cordia trichotoma* por miniestaquia. *Ciência Florestal*, 23(3): 491-499.

Kielse, P., Bisognin, D.A., Haygert, K.L., Mello, U.S., Pimentel, N., Raube, M.A. (2015) Production and rooting of *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. mini-cuttings collected from mini-stumps of asexual and seminal origin. *Ciência Rural*, 45(7):1164-1166. DOI: 10.1590/0103-8478cr20131011.

Lee, H.W., Kim, M.J., Lee, H., Kim, J. (2024) Enhancer of Shoot Regeneration¹ promotes de novo root organogenesis after wounding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 36(6):2359-2374. DOI: 10.1093/plcell/koae014.

Li, S.W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., An, L. (2009) Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 65(1): 63-71.

Lischweski, S., Muchow, A., Guthörl, D., Hause, B., Hause, G. (2015) Jasmonates act positively in adventitious root formation in petunia cuttings. *BMC Plant Biology*, 15:229. DOI: 10.1186/s12870-015-0614-3.

Liu, Y., Wei, L., Feng, L., Zhang, M., Hu, D., Tie, J., Liao, W. (2022) Hydrogen sulfide promotes adventitious root development in cucumber under salt stress by enhancing antioxidant ability. *Plants*, 11(7):935. DOI: 10.3390/plants11070935.

Lopes, G.L. (2011) *Cordia trichotoma* – Louro-pardo, Freijó: Resistência da madeira ao cupim subterrâneo em ensaio de preferência alimentar. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 2(1): 57-62.

Luebert, F., Cecchi, L., Frohlich, M.W., Gottschling, M., Guillems, C.M., Hasenstab-Lehman, K.E., Hilger, H.H., Miller, J.S., Mittelbach, M., Nazaire, M., Nepi, M., Nocentini, D., Ober, D., Olmstead, R.G., Selvi, F., Simpson, M.G., Sutorý, K., Valdés, B., Walden, G.K. and Weigend, M. (2016) Familial classification of the Boraginales. *Taxon*, 65(3):502-522. DOI:10.12705/653.5.

Luo, C., Liu, X., Zheng, Y., Dai, X., Tang, X., Zhang, T., Zhang, X. (2024) Physiological and transcriptomic analysis reveal the regulation of adventitious root formation in *Cinnamomum parthenoxylon* cuttings. BMC Plant Biology. doi: 10.1186/s12870-024-05941-5.

Ma, B., Yin, C.C., He, S.J., Lu, X., Zhang, W.K., Lu, T.G., Chen, S.Y., Zhang, J.S. (2014) Ethylene-induced inhibition of root growth requires abscisic acid function in rice seedlings. PLoS Genetics. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004701.

Matos, I.F. (2021) Metabolismo do ácido ascórbico e sua inter-relação com a cadeia transportadora de elétrons mitocondriais em plantas. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 103p.

Miller, J.S., Gottschling, M. (2007) Generic classification in the Cordiaceae (Boraginales): Resurrection of the genus *Varronia* R. Br. Taxon, 56: 163-169.

Murata, Y., Pei, Z.M., Mori, I.C., Schroeder, J. (2001) Absciscic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is disrupted upstream and downstream of ROS production in *abi1-1* and *abi2-1* mutants. Plant Cell, 13: 2513-2523.

Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology, 22: 867-880.

Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J. (2002) Hydrogen peroxide signalling. Current Opinion in Plant Biology. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00282-0.

Noctor, G., Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 249-279.

Nunes, A.C.P., Santos, T.C., Romão, K.C.S., Santos, A.P., Gallo, R. (2024) Early selection efficiency in a progeny test of timber species *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. Industrial Crops and Products, 221:11393. DOI: 10.1016/j.indcrop.2024.119393.

Oliveira, T.R., Balfagón, D., Sousa, K.R., Aragão, V.P.M., Oliveira, L.F., Floh. E.I.S., Silveira, V., Gómez-Cadenas, A., Santa-Catarina, C. (2022) Long-term subculture affects rooting competence via changes in the hormones and protein profiles in *Cedrela fissilis* shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 148:137-153. DOI: 10.1007/s11240-021-02139-z.

Pacurar, D.I., Perrone, I., Bellini, C. (2014) Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. Physiologia Plantarum, 151(1): 83-96.

Paes, J.B., Melo, R.R., Lima, C.R., Oliveira, E. (2007) Resistência natural de sete madeiras da região de Lavras-MG ao ataque de fungos apodrecedores em ensaio de laboratório. Revista Árvore, 13(2):160-169. DOI: 10.1590/S0100-67622007000500020.

Pan, C., Lu, H., Liu, J., Yu, J., Wang, Q., Li, J., Yang, J., Hong, H., Yan, C. (2019) SODs involved in the hormone-mediated regulation of H₂O₂ content in *Kandelia obovata* root tissues under cadmium stress. Environmental Pollution, 256:113272. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113272.

Pessanha, P.G.O., Xavier, A., Otoni, W.C. (2018) Enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em diferentes épocas do ano. Revista Árvore. 42(1): e420101.

Piña-Rodrigues, F.C.M., Silva, J.M.S. (2021) Silvicultura tropical: o potencial madeireiro e não madeireiro das espécies tropicais. Embrapa Florestas, 1ª edição, p.176-201.

Pisa, M.A., Soares, M.K.M., Martins, D.A., Vieira, R.F. (2003) Estresse oxidativo em plantas: mecanismos de ação e avaliação. *Revista Brasileira de Agrociência*, 9(3): 297-304.

R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, p 1-42.

Radomski, M.I., Santos, A.F., Barroso, D.G. (2012) Variação fenotípica em populações naturais de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. no estado do Paraná. *Scientia Forestalis*, 40(94): 213-221.

Rasmussen, A., Hosseini, S.A., Hajirezaei, M.R., Druege, U., Geelen, D. (2015) Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 66(5):1437-1452. DOI:10.1093/jxb/eru547.

Reflora. (2025) *Cordia* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB16536>. Acesso em 17/08/2025.

Rodrigues, M.C.C., Matos, I.F., Costa, A.P.S., Oliveira, J.G., Barroso, D.G. (2023). Ajustes de protocolos para a determinação da atividade enzimática antioxidante em miniestacas de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. Anais do XV Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica / VIII Congresso Fluminense de Pós-Graduação, Campos dos Goytacazes. Anais eletrônicos, Galoá.

Rolim, S.G., Piña-Rodrigues, F.C.M., Piotto, D., Batista, A., Freitas, M.L.M., Brienza Junior, S., Zakia, M.J.B., Calmon, M. (2020) Prioridades e lacunas de pesquisa e desenvolvimento em silvicultura de espécies nativas no Brasil. WRI Brasil, Working Paper, 1ª edição, São Paulo, 44p.

Sagisaka, K. (1982) Comparative studies on the metabolic function of differentiated xylem and living bark of wintering perennials. *Plant Cell Physiology*, 23: 1337-1346.

Santos, A.F. (2018) Silvicultura de espécies nativas: avanços e desafios. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, 13(1): e5528.

Santos, W., Souza, B.M., Zulian, D.F., Alves, G.T.R., Gomes, J.B.V. G, Moraes, M.L. T., Sousa, V.A., Aguiar, A.V. (2021) Genotype–environment interaction in *Cordia trichotoma* progenies in two different soil conditions. Journal of Forestry Research,33:309-319. DOI: 10.1007/s11676-021-01337-5.

Scheeren, L.W., Schneider, P.S.P., Schneider, P.R., Finger, C.A.G. (2002) Crescimento do louro-pardo, *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud., na depressão central do estado do Rio Grande do Sul. Ciência Florestal, 12(2): 169-176.

Silva, M.K.F., Siqueira, D.P., Carvalho, G.C.M.W., Silva, R.D., Silva, R.M.R., Barroso, D.G. (2022) Hydrogen peroxide enhanced indole-3-butyric acid effects on *Cordia trichotoma* adventitious rooting. Rhizosphere, 22:100533. DOI: 10.1016/j.rhizo.2022.100533.

Silva, M.K.F., Siqueira, D.P., Carvalho, G.C.M.W., Silva, R.D.D., Aguiar, A.V., Barroso, D.G. (2021) Vegetative rescue of *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. via induction of epicormic sprouts in branches from mature trees. Rhizosphere,20:100431. DOI: 10.1016/j.rhisph.2021.100431.

Silva, R.M.R. (2022) Ácido indol-3-butírico, peróxido de hidrogênio e paclobutrazol na miniestaquia de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,83p.

Soares, A.M., Ramos, S.J., Guilherme, L.R.G. (2009) Oxidação de metais pesados em plantas: mecanismos e implicações na tolerância vegetal. Revista de Ciências Agrárias, 52(1): 1-8.

Steffens, B. (2014) The role of ethylene and ROS in adventitious root formation. In: Ramawat KG (ed.). Tree Biotechnology. CRC Press, 443-457 p.

Steffens, B., Rasmussen, A. (2016) The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170(2): 603-617.

Strader, L.C., Bartel, B. (2011) Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. *Molecular Plant*, 4(3): 477–486.

Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M., Murphy, A. (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*, 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, p. 665-693.

Trianoski, R., Iwakiri, S. (2018) Pure and Decorative Plywood Panels from *Cordia trichotoma* and *Grevillea robusta*. *Floresta e Ambiente*, 25(3):e20170024. DOI:10.1590/2179-8087.024116.

Venables, W.N., Ripley, B.D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. 4ª edição. New York: Springer, p. 107-178.

Villacorta-Martín, C., Sánchez-García, A.B., Barros, P.M., Testillano, P.S., Rigola, D., Van der Linden, G., Cornish, K., Segarra, G., Pérez-Pérez, J.M. (2015) Gene expression profiling during adventitious root formation in carnation stem cuttings reveals crosstalk between auxin and ethylene signaling. *BMC Genomics*, 16:789. DOI: 10.1186/s12864-015-2003-5.

Vu, Q.V. (2011) ggbiplot: a ggplot2 based biplot. R package version 0.55.

Wendling, I., Trueman, S.J., Xavier, A. (2014) Maturation and related aspects in clonal forestry—Part II: Reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests*, 45: 473-486.

Wille, L.F., Kielse, P., Bisognin, D.A. (2017) Propagação de *Cordia trichotoma* por miniestaquia: efeito de diferentes substratos e concentrações de AIB. *Ciência Florestal*, 27(3): 939-948.

Xavier, A., Wendling, I., Silva, R.L. (2009) Silvicultura clonal: princípios e técnicas. Viçosa – MG: Ed. UFV, p. 88-115.

Zhang, M., Zhang, H., Xu, L. (2017) Hydrogen peroxide-induced root formation is enhanced by exogenous calcium in cucumber explants. Horticulture Research, 309:111666. DOI: 10.1038/hortres.2017.43.

Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D.W., Song, C.P. (2001) Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. Plant Physiology, 126: 1438-1448.

APÊNDICE: Análises de variância e testes de média

Tabela 3. Análise de variância da sobrevivência aos 180 dias de miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de minicepas com 2 e 5 anos após a semeadura, tratadas com diferentes concentrações de AIB (0, 2000, 4000, 6000 ou 8000 mg L⁻¹) e H₂O₂ (0 ou 50 mmol.L⁻¹).

Fonte de variação	GL	Quadrado
		Médio
		ST (%)
H ₂ O ₂	1	3,12
Idade	1	205,87*
AIB	4	6,49
H ₂ O ₂ x Idade	4	4,81
H ₂ O ₂ x AIB	4	5,92
Idade x AIB	4	0,61
H ₂ O ₂ x Idade x AIB	4	0,25
Resíduo	60	205,78
Coeficiente de variação (%)		31,87

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.
A variável ST (%) foi transformada em \sqrt{x} .

Tabela 4. Análise de variância das características avaliadas no enraizamento de miniestacas de *Cordia trichotoma* produzidas a partir de minicepas com 2 anos após a semeadura, submetidas a diferentes concentrações tratadas com diferentes concentrações de AIB (0, 2000, 4000, 6000 ou 8000 mg L⁻¹) e H₂O₂ (0 ou 50 mmol.L⁻¹). SE= Sobrevivência na expedição da câmara de nebulização; SCV= Sobrevivência na casa de vegetação; ST=Sobrevivência total, aos 180 dias; E= enraizamento ao leve toque aos 60 dias; A= altura; DAC= diâmetro do colo; Brotação= porcentagem de plantas que emitiram novas brotações; NRPO=Número de raízes de primeira ordem; CTRPO= comprimento total de raízes de primeira ordem; MSPA= massa seca da parte aérea; MSSR=massa seca do sistema radicular; IQD= índice de qualidade de Dickson (IQD).

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio											IQD
		SE	SCV	ST	E	A	DAC	Brotação	NRPO	CTRPO	MSPA	MSSR	
		(%)	(%)	(%)	(%)	(cm)	(mm)	(%)		(cm)	(g)	(g)	
H ₂ O ₂	1	2,56	0,01	3,01	0,53	0,17	0,003	0,16	0,00	0,29	0,02	0,03	0,03
AIB	4	4,54	1,99	3,52	10,13*	1,59*	0,012*	1,66	0,04	4,37	0,23*	0,09	0,04
H ₂ O ₂ x AIB	4	3,39	1,92	1,47	2,16	0,29	0,003	0,67	0,00	0,58	0,10	0,07	0,03
Resíduo	30	2,66	2,49	3,26	2,67	8,02	0,003	1,31	0,04	2,86	0,07	0,06	0,93
Coefficiente de variação (%)		18,57	16,26	24,30	31,87	14,20	7,65	19,76	31,82	21,40	26,74	24,80	25,68

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. As variáveis SE (%), SCV (%), ST (%), Brotação (%) e MSSR(g) foram transformadas em \sqrt{x} , E (%) foi transformado em $\sqrt{x} + 1$.

Tabela 5. Análise de variância do conteúdo endógeno dos hormônios ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC); ácido indolbutírico (AIB); ácido indolacético (AIA); ácido salicílico (AS); ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (AJ) em miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de três tipos de matrizes: (i) origem seminal 2 anos, (ii) origem seminal 5 anos, e (iii) origem clonal 5 anos após resgate. As concentrações foram quantificadas nanograma por grama de massa fresca (MF).

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio					
		ACC	AIB	AIA	AS	ABA	AJ
		(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)
Tratamento	2	0,01*	0,01	1,34*	0,08*	0,54*	0,18*
Resíduo	12	0,0004	0,5486	0,0060	0,0040	0,02	0,01
Coeficiente de variação (%)		14,29	38,25	6,33	11,46	6,61	13,62

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

As variáveis ACC e AS foram transformadas em $x + 1$ AIA, AIB, ABA e AJ foram transformadas em $\frac{1}{\sqrt{x}}$.

Tabela 6. Análise de variância da atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX); catalase (CAT); dehidroascorbato redutase (DHAr); glutathione redutase (GR); monodehidroascorbato redutase (MDHAr); peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em miniestacas de *Cordia trichotoma* oriundas de três tipos de matrizes: (i) minicepas com 2 anos de idade; (ii) minicepas com 5 anos de idade; e (iii) minicepas resgatadas vegetativamente.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio						GR (nmoles NADPH. min- 1.mg ⁻¹ ptn)
		SOD (U. mg ⁻¹ . ptn)	POD (umoles H ₂ O ₂ . min-1. mg ⁻¹ .ptn)	CAT (nmoles AsA. min ⁻¹ .mg ⁻¹ ptn)	APX (nmoles AsA. Min ⁻¹ .mg ⁻¹ ptn)	MDHAr (nmoles NADH. min-1.mg ⁻¹ ptn)	DHAr (nmoles ASA. min-1.mg ⁻¹ ptn)	
Tratamento	2	0,03*	2288,10*	11339,00	5882,00	129,90	1609,00	2,27
Resíduo	12	0,01	195,70	3433,00	4049,00	136,40	1685,00	7,32
Coeficiente de variação (%)		11,48	45,16	91,26	88,72	49,58	73,34	74,67

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 7. Análise de variância das características avaliadas no enraizamento de miniestacas de *Cordia trichotoma* produzidas a partir de minicepas com 2 anos submetidas a três diferentes condições: (i) imersão em água deionizada por 20 horas com aeração forçada nas últimas 12 horas (H₂O), (ii) imersão por 8 horas em 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ seguida de 12 horas em AIB 300 mg L⁻¹ com aeração forçada (H₂O₂+ AIB), e (iii) miniestacas recém-coletadas. SE= Sobrevivência na expedição da câmara de nebulização; SCV = Sobrevivência na casa de vegetação; ST = Sobrevivência total, aos 180 dias; E = enraizamento ao leve toque aos 60 dias; A = altura; DAC = diâmetro do colo; Brotação = porcentagem de plantas que emitiram novas brotações; CTB = comprimento total das brotações aos 180 dias; NRPO = Número de raízes de primeira ordem ; CTRPO = comprimento total de raízes de primeira ordem; MSPA = massa seca da parte aérea; MSSR=massa seca do sistema radicular; IQD = índice de qualidade de Dickson (IQD).

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio												
		SE (%)	SCV (%)	ST (%)	E (%)	A (cm)	DAC (mm)	Brotação (%)	CTB (cm)	NRPO	CTRPO (cm)	MSPA (g)	MSSR (g)	IQD
Tratamento	2	2,013	0,90	2,21	5,74	58,33	2,55*	1,18	19,91	4,04	355*	2,16	0,80*	0,17*
Resíduo	12	1,996	0,55	1,77	2,46	19,36	0,40	2,87	48,76	1,18	78	0,64	0,08	0,012
Coeficiente de variação (%)		19,8	7,84	20	29,89	36,28	14,57	45,48	48,36	47,88	31,34	45,92	13,14	9,14

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

As variáveis SE (%), SCV (%), ST (%), Brotação (%) foram transformados em \sqrt{x} e E(%) foi transformado em $\sqrt{x} + 1$

Tabela 8. Análise de variância do conteúdo endógeno dos hormônios ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC); ácido indolbutírico (AIB); ácido indolacético (AIA); ácido salicílico(AS);ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (AJ) em miniestacas de *Cordia trichotoma* submetidas a três diferentes condições: (i) imersão em água deionizada por 20 horas com aeração forçada nas últimas 12 horas (H₂O), (ii) imersão por 8 horas em 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ seguida de 12 horas em AIB 300 mg L⁻¹ com aeração forçada (H₂O₂+ AIB), e (iii) miniestacas recém-coletadas.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio					
		ACC	AIB	AIA	AS	ABA	AJ
		(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)	(ng.g ⁻¹ .MF)
Tratamento	2	0,07	2,46	0,15	0,70	0,63	0,34
Resíduo	12	0,01	0,01	0,002	0,10	0,02	0,01
Coeficiente de variação (%)		24,38	15,49	11,35	15,86	14,30	34,84

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

AIA, AIB e AJ foram transformadas em $x + 1$ e ABA transformada em $\frac{1}{\sqrt{x}}$

Tabela 9. Análise de variância da atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX); catalase (CAT); dehidroascorbato redutase (DHAr); glutatona redutase (GR); monodehidroascorbato redutase (MDHAr); peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) em miniestacas de *Cordia trichotoma* submetidas a três diferentes condições: (i) imersão em água deionizada por 20 horas com aeração forçada nas últimas 12 horas (H₂O), (ii) imersão por 8 horas em 50 mmol.L⁻¹ de H₂O₂ seguida de 12 horas em AIB 300 mg L⁻¹ com aeração forçada (H₂O₂+ AIB), e (iii) miniestacas recém-coletadas.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio						
		SOD	POD	CAT	APX	MDHAr	DHAr	GR
		(U. mg ⁻¹ . ptn)	(umoles H ₂ O ₂ . min ⁻¹ . mg ⁻¹ .ptn)	(nmoles AsA. min ⁻¹ . 1.mg ⁻¹ ptn)	(nmoles AsA. min ⁻¹ . 1.mg ⁻¹ ptn)	(nmoles NADH. min ⁻¹ . 1.mg ⁻¹ ptn)	(nmoles ASA. min ⁻¹ . 1.mg ⁻¹ ptn)	(nmoles NADPH. min ⁻¹ .mg ⁻¹ ptn)
Tratamento	2	0,003	993,80*	11708,00*	13948,00	2,21	223,90	348,30
Resíduo	12	0,005	217,20	2581,00	5284,00	492,60	690,60	91,20
Coeficiente de variação								
(%)	11,47		33,16	81,85	73,83	68,38	49,69	114,73

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F