

FABIANA SCHMIDT BANDEIRA

ENXERTIA *IN VITRO* DE CLONES DE  
*Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

FABIANA SCHMIDT BANDEIRA

ENXERTIA *IN VITRO* DE CLONES DE  
*Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA EM: 18 de fevereiro de 2004.

---

Prof. José Maria Moreira Dias  
(Conselheiro)

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Conselheiro)

---

Prof. Eduardo Euclides de Lima e Borges

---

Prof. José Mauro Gomes

---

Prof. Aloisio Xavier  
(Orientador)

*À minha família, especialmente aos meus pais José Carlos (in memoriam) e Sandra.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida.

À minha querida mãe, exemplo de vida e determinação, pelo amor, apoio e incentivo dedicados em todos os momentos.

Às minhas avós Edméa e Lêda, verdadeiras “mães suplentes” e aos meus irmãos, André Luis e Débora, pelo estímulo, carinho e compreensão.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, pela oportunidade de realização deste treinamento e qualificação profissional.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Aloisio Xavier, pela orientação, lições de vida, amizade e confiança.

Aos meus conselheiros, Prof. Wagner e Prof. José Maria e aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões.

À grande amiga Solange, pela convivência, amizade e pelo companheirismo durante os momentos importantes.

À amiga Lourdes, pela grande ajuda na realização dos trabalhos no Laboratório de Anatomia Vegetal.

A amiga Andréa, pelos conselhos, paciência e consolo nas horas difíceis.

Às amigas Maurecilne, Ana Paula e Letícia, pelos valiosos conselhos, críticas e sugestões e pela verdadeira amizade.

Aos amigos Márcio (“Marcinho”) e Miranda, pela ajuda com a análise estatística.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Silvicultura Clonal (GSC), Miranda, Elisa, Flávio, Ana Paula, Fernanda, Glêison, Edson, Patricia e Alexandra pela ajuda, convivência e cooperação e em especial ao Marcos, pelo acompanhamento direto, empenho e interesse em todas as atividades desenvolvidas.

Aos grandes amigos e companheiros do Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV), especialmente à Lili e ao Prof. Wagner, pelos anos de convivência, amizade, ensinamentos e amparo em todos os momentos, porque sem eles, não concretizaria este trabalho.

Aos colegas Edival e Miguel da Patologia Florestal, pela atenção e ajuda na obtenção das imagens utilizadas neste trabalho.

A todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Fabiana Schmidt Bandeira, filha de José Carlos Soares Bandeira e Sandra Maria Cardoso Schmidt, nasceu em 02 de maio de 1978, em Brasília, DF.

Em 1992, concluiu o 1<sup>o</sup> grau no Ginásio da Asa Norte (GAN), em Brasília, DF. Em 1995, concluiu o 2<sup>o</sup> grau no Centro Educacional da Asa Norte (CAN), em Brasília, DF.

Em 2001, diplomou-se Engenheira Florestal pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em abril de 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na área de concentração em Silvicultura, na UFV, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2004.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Propagação clonal .....	3
2.2. Enxertia <i>in vitro</i> .....	6
2.3. Enxertia <i>in vitro</i> em espécies lenhosas .....	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	16
<b>ENXERTIA <i>IN VITRO</i> NA PROPAGAÇÃO DE CLONES DE <i>Eucalyptus urophylla</i> X <i>E. grandis</i>.....</b>	<b>21</b>
RESUMO .....	21
ABSTRACT .....	21
1. INTRODUÇÃO .....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
2.1. Obtenção e preparo dos porta-enxertos .....	24
2.2. Obtenção e preparo dos enxertos .....	25
2.3. Enxertia <i>in vitro</i> .....	27
2.4. Análise histológica.....	28
2.5. Avaliações .....	29

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
3.1. Porcentagem de pegamento das plantas enxertadas <i>in vitro</i> .....	29
3.2. Crescimento em altura das plantas enxertadas <i>in vitro</i> .....	36
3.3. Análise histológica .....	38
4. CONCLUSÕES .....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

<b>ACLIMATIZAÇÃO <i>EX VITRO</i> DE PLANTAS PROPAGADAS PELA ENXERTIA <i>IN VITRO</i> DE CLONES DE <i>Eucalyptus urophylla</i> X <i>E. grandis</i>.....</b>	<b>46</b>
RESUMO .....	46
ABSTRACT .....	46
1. INTRODUÇÃO .....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4. CONCLUSÕES .....	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
4. CONCLUSÕES GERAIS .....	60



## RESUMO

BANDEIRA, Fabiana Schmidt, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*.** Orientador: Aloisio Xavier. Conselheiros: José Maria Moreira Dias e Wagner Campos Otoni.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da enxertia *in vitro* na propagação de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. Foram utilizados porta-enxertos juvenis obtidos de sementes de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, germinadas em condições assépticas. As avaliações foram realizadas quanto ao percentual de pegamento e crescimento em altura dos enxertos durante a etapa *in vitro* (aos 35 e 50 dias) e quanto à sobrevivência e crescimento em altura das plantas enxertadas *in vitro*, após a etapa de aclimatização nas condições *ex vitro* (aos 25, 32, 50 e 70 dias), em relação a diferentes tempos de permanência das plantas no escuro após a enxertia (0, 7, 14 e 21 dias). Foi realizada a análise histológica da região de união dos enxertos aos 7, 14, 21, 28 e 50 dias após a enxertia *in vitro*. Verificou-se que os processos de cicatrização do calo formado na região de injúria e reconexão vascular das plantas enxertadas ocorreram aos 14 dias após a enxertia. Com relação ao crescimento em altura, observou-se durante a etapa *in vitro*, comportamento semelhante entre os clones e os porta-enxertos utilizados. Quanto ao percentual de pegamento dos enxertos *in vitro*, para o clone 1, os

melhores resultados (87%) foram obtidos quando as plantas permaneceram por até 14 dias no escuro após a enxertia, enquanto que para o clone 2, melhores respostas (93%) foram observadas no tempo de 7 dias no escuro. Quanto ao maior tempo no escuro (21 dias), o clone 2, enxertado em plântulas de *Eucalyptus urophylla* mostrou maior sensibilidade, com perda de vigor das plantas e grande parte dos enxertos oxidados, resultando em número reduzido de plantas sobreviventes à fase de transferência para as condições *ex vitro*. No que se refere à etapa de aclimatização e rustificação *ex vitro*, não houve diferença significativa entre os clones e entre os tratamentos de escuro na condição inicial *in vitro*. Os resultados obtidos permitiram concluir que a metodologia de enxertia *in vitro* adotada se mostrou eficiente e com potencial de aplicação na propagação clonal e em estudos relacionados ao rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*, representados pela elevada taxa de sobrevivência das plantas enxertadas, atingindo até 87% ao final da etapa de aclimatização *ex vitro*.

## ABSTRACT

BANDEIRA, Fabiana Schmidt, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2004. ***Eucalyptus urophylla* X *E. grandis* clones *in vitro* graftings**. Adviser: Aloisio Xavier. Committee Members: José Maria Moreira Dias and Wagner Campos Otoni.

The objective of this work was to evaluate the *in vitro* grafting efficiency on the propagation of two *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis* clones. Juvenile stocks obtained from *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* germinated in aseptic conditions were used. The evaluations to verify the success percentage and graftings height growth during the *in vitro* stage (at 35 and 50 days), and survival and height growth of the grafted plants *in vitro* after the acclimation stage in the *ex vitro* conditions (at 25, 32, 50 and 70 days) in relation to various periods of permanence of the plants in the dark after grafting (0, 7, 14 and 21 days) were done. The histologic analysis made on the union region of the graftings was made at 7, 14, 21, 28 and 50 days after the *in vitro* grafting. It was observed that the cicatrization processes of the callus formed on the damaged region and the vascular reconnection on the grafted plants occurred at 14 days after grafting. In relation to height growth during the *in vitro* stage it was observed a similar behavior between the clones and the stock used. As to the success percentage of the *in vitro* graftings, for the clone 1, the best results (87%) were obtained when the plants were maintained in the dark

for until 14 days after grafting, and for clone 2, the best response (93%) was observed for the dark permanence time of 7 days. In the greatest period of darkness (21 days), the clone 2 grafted on *Eucalyptus urophylla* saplings showed a greater susceptibility, with vigor loss of the plants and most of the graftings oxidized which resulted in a reduced number of plants surviving the stage of transference to *ex vitro* conditions. In the stage of *ex vitro* acclimation and hardening, there was no significant difference between the clones and dark treatments in relation to the initiated *in vitro* condition. The results obtained allow to conclude that the *in vitro* grafting methodology adopted showed to be efficient and has potential of use in the clonal propagation and in studies related to clonal rejuvenation of *Eucalyptus* spp., which are represented by the high survival rate of the grafted plants, which was up to 87% at the end of the *ex vitro* acclimation stage.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A adoção das técnicas de propagação vegetativa tem proporcionado inúmeros benefícios ao setor florestal brasileiro, principalmente pela formação de plantios clonais homogêneos e produtivos, aliada à melhoria da qualidade da madeira e de seus produtos. Entre as técnicas de propagação vegetativa, o enraizamento de estacas tornou-se a mais difundida, em razão da viabilidade econômica no estabelecimento dos plantios clonais. Entretanto, apresenta limitações em relação ao seu uso, atribuídas à variação existente entre genótipos e à redução gradual da capacidade de enraizamento, associada ao envelhecimento ontogenético das plantas (Assis, 1997).

Nesse contexto, em função da crescente demanda por matérias-primas florestais, tem-se estimulado o desenvolvimento das técnicas de propagação vegetativa, buscando contornar os problemas técnicos e operacionais apresentados pela estaquia, resultando em maior eficiência no processo de produção de mudas clonais, principalmente para o gênero *Eucalyptus*. Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de microestaquia e miniestaquia, ganhos consideráveis têm sido alcançados na produção de mudas clonais de eucalipto, principalmente no que tange à maximização dos índices de enraizamento adventício (Xavier *et al.*, 2001).

Com relação às técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação tem sido aplicada com sucesso no rejuvenescimento de clones de interesse comercial, que

apresentam dificuldades de enraizamento, devido ao grau de maturação dos propágulos utilizados. Esta técnica tem merecido especial atenção na Silvicultura clonal de *Eucalyptus*, uma vez que a microestaquia possibilita a formação de jardins microclonais, constituindo a base para o processo de produção de mudas clonais. Titon (2001) ressalta a importância da microestaquia no processo de produção de mudas, justificável principalmente para clones de difícil enraizamento.

Por outro lado, a enxertia *in vitro* apresenta potencial de aplicação na propagação clonal de *Eucalyptus*, objetivando a limpeza clonal, o rejuvenescimento de clones recalcitrantes à propagação *in vitro* e a produção de mudas destinadas à formação de Pomar de Sementes Clonal.

Esta técnica consiste em enxertar, sob condições assépticas, um ápice caulinar constituído de dois a três pares de folhas sobre um porta-enxerto estabelecido *in vitro* (Jonard, 1986; Moore, 1991; George, 1993).

Alguns trabalhos relatam a aplicação da enxertia *in vitro* como estratégia associada aos programas de melhoramento genético (Abousalim e Mantell, 1992), na obtenção de plantas isentas de patógenos (Paiva *et al.*, 1993; Mukhopadhyay *et al.*, 1997), no rejuvenescimento de clones adultos (Perrin *et al.*, 1994; Ewald e Kretzschmar, 1996), em estudos sobre a detecção precoce da incompatibilidade (Errea *et al.*, 1994; Errea, 1998; Errea *et al.*, 2001; Estrada-Luna *et al.*, 2002) e como método alternativo para a propagação vegetativa de certas espécies lenhosas (Kretzschmar e Ewald, 1994; Monteuis, 1994; Monteuis, 1995; Ramanayake e Koor, 1999; Troncoso *et al.*, 1999; Mneney e Mantell, 2001; Thimmappaiah e Puthra, 2002).

Considerando a importância e o potencial de aplicação da enxertia *in vitro* na propagação clonal de *Eucalyptus*, aliada à carência de estudos nesta linha de pesquisa, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência da enxertia *in vitro* de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Propagação clonal

A propagação clonal ou propagação vegetativa consiste na multiplicação de plantas sem que haja o envolvimento dos órgãos sexuais, ou seja, não ocorre a recombinação genética observada na propagação sexuada, permitindo que a constituição genética permaneça inalterada nas plantas resultantes, assegurando a fidelidade do genótipo da planta doadora (Xavier, 2002). Ademais, a propagação vegetativa possibilita a obtenção de plantios com maior uniformidade e produtividade (Chaperon, 1987; Assis, 1996; Comério *et al.*, 1996), adaptação de clones específicos para determinados sítios, bem como a maximização da produção de madeira em comparação com os plantios oriundos de mudas produzidas via seminífera (Xavier e Comério, 1996). Durand-Cresswell *et al.* (1982) e Zobel (1993) ressaltam que a propagação vegetativa permite ainda a produção massal de genótipos superiores e de desempenho conhecido em campo, havendo a captura total do potencial genético de indivíduos que reúnem características desejáveis.

Dentre as principais técnicas adotadas na propagação clonal em grande escala, a estaquia é a mais difundida em função de sua rusticidade operacional (Xavier e Wendling, 1998) e dos menores custos de implementação em relação ao cultivo *in vitro* (Xavier e Comério, 1996). No entanto, esta técnica apresenta

limitações no que concerne à dificuldade de clonagem de materiais adultos, em função do grau de maturação dos propágulos utilizados, implicando na redução da competência ao enraizamento em alguns clones (Bonga e Durzan, 1987; Bonga e Von Aderkas, 1992; Greenwood e Hutchison, 1993; Assis, 1997).

Diante desse panorama, a posição ocupada pelo Brasil frente ao cenário tecnológico mundial na Silvicultura clonal intensiva em espécies do gênero *Eucalyptus* e a crescente demanda por matérias-primas florestais, conduziram a consideráveis investimentos em pesquisa aplicada, no intuito de possibilitar o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de propagação vegetativa, viabilizando a produção de mudas em escala comercial de clones com restrições à macropropagação. Neste contexto, as técnicas de microestaquia e miniestaquia permitiram avanços significativos na formação de mudas com maior percentual, velocidade e qualidade de enraizamento, utilizando-se para esse fim, propágulos vegetativos com maior grau de juvenilidade (Oliveira, 2003). Comparando as duas técnicas para clones com dificuldade de enraizamento, Titon (2001) constatou ainda maior eficiência de enraizamento em resposta ao rejuvenescimento *in vitro* pelo uso da microestaquia.

Por outro lado, a enxertia em *Eucalyptus*, técnica de propagação vegetativa de grande aplicação na clonagem de espécies frutíferas e de seringueira, tem sido limitada aos programas de pesquisa e desenvolvimento em melhoramento genético.

Na clonagem de seringueira, a enxertia é considerada a principal técnica para a propagação vegetativa e estabelecimento de plantios comerciais com clones de alta produtividade em látex e resistentes a certas doenças.

Na área florestal, a enxertia permite a perpetuação de clones que não se propagam por enraizamento adventício; obtenção de benefícios de certos porta-enxertos, tais como a resistência a doenças; assegurar as características genéticas da planta que se quer multiplicar; propiciar, sob algumas condições, floração e frutificação precoces; transformação de plantas estéreis em plantas produtivas e a sua utilização como técnica de rejuvenescimento de clones de difícil propagação clonal (Xavier, 2002). Hartmann *et al.* (1997) sugerem ainda, a possibilidade de se



obterem plantas com formas especiais, produção de plantas para atender estudos de eliminação de vírus e outras doenças, substituição de partes danificadas do sistema radicular e parte aérea de árvores e estudar seus processos morfofisiológicos.

No entanto, embora seja uma técnica conhecida há muitas décadas, a enxertia apresenta algumas desvantagens no processo de produção de mudas de *Eucalyptus*, destacando-se os possíveis problemas relacionados com a incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, levando, em alguns casos, a elevados índices de rejeição em certas espécies, além de exigir alto grau de refinamento e habilidade do enxertador, resultando em menor aplicação operacional desta técnica (Xavier, 2002).

Na área florestal, a enxertia tem sido utilizada extensivamente na propagação clonal, visando a formação de pomares de sementes de muitas espécies tais como o *Pinus radiata*, *P. elliottii*, *P. caribea*, *Araucaria cunninghamii*, *Eucalyptus nitens*, *Pseudotsuga menziesii*, dentre outras (Hartmann *et al.*, 1997).

Esse sistema é utilizado em *Eucalyptus* para preservar a capacidade de florescimento dos enxertos em programas de polinização controlada, visando o estabelecimento de pomares de sementes e a multiplicação de árvores selecionadas sobre porta-enxertos com características desejáveis (Durand-Cresswell *et al.*, 1982).

Em relação às técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação tem sido a de maior aplicação na área florestal. Entretanto, outras técnicas, como a enxertia *in vitro*, apresentam potencialidade de uso em espécies florestais, particularmente quanto à possibilidade de rejuvenescimento de materiais genéticos selecionados de *Pinus* e *Eucalyptus*.

Entre as inúmeras vantagens apresentadas pela propagação *in vitro*, vale ressaltar a marcada redução do espaço físico para a multiplicação de grande número de plantas em curto espaço de tempo e durante qualquer época do ano; a possibilidade de obter plantas isentas de patógenos, visto que as condições de cultivo são assépticas; a maior flexibilidade no ajuste dos meios de cultura e controle das condições ambientais *in vitro*, tais como luz e temperatura; a alternativa para a propagação de clones que demonstram dificuldade de propagação

vegetativa pelos métodos convencionais (George, 1993; Grattapaglia e Machado, 1998). Em *Eucalyptus*, a micropropagação constitui uma ferramenta do melhoramento florestal, promovendo o rejuvenescimento de clones para a utilização em programas comerciais (Xavier e Comério, 1996).

Dessa forma, a micropropagação tem sido alvo de interesse de muitas empresas florestais, objetivando o rejuvenescimento de clones comerciais que apresentam dificuldades de enraizamento pelos métodos tradicionais de propagação clonal. Mais do que isso, essa ferramenta da biotecnologia permite a ampliação de oportunidades para a multiplicação rápida e eficiente de genótipos superiores, bases para o processo de transformação genética, e para o desenvolvimento dos programas de melhoramento florestal (Xavier, 2002).

Apesar de suas vantagens, a micropropagação apresenta limitações quanto aos aspectos técnicos e econômicos, uma vez que depende da infra-estrutura de um laboratório de cultura de tecidos, tornando o processo de produção de mudas oneroso, além da dificuldade de cultivo *in vitro* apresentada por alguns materiais genéticos (Xavier *et al.*, 2001).

Embora sejam expressivos os ganhos obtidos com o avanço das técnicas de clonagem para a produção de mudas em espécies de *Eucalyptus*, alguns problemas ainda persistem quanto à propagação vegetativa de clones recalcitrantes ao cultivo *in vitro*, em função da dificuldade de rejuvenescimento apresentada por algumas espécies. Dessa forma, a enxertia *in vitro* tem demonstrado potencial no rejuvenescimento de clones de *Pinus* e *Eucalyptus*, podendo tornar viável o processo de clonagem de materiais genéticos selecionados.

## **2.2. Enxertia *in vitro***

A enxertia *in vitro* consiste em enxertar, sob condições assépticas, um ápice caulinar contendo dois a três primórdios foliares, sobre um porta-enxerto estabelecido *in vitro* (Jonard, 1986; Moore, 1991; George, 1993).

A enxertia *in vitro* foi inicialmente desenvolvida por Murashige *et al.* (1972), buscando a obtenção de plantas cítricas livres de vírus. Posteriormente, esta técnica foi aperfeiçoada por Navarro *et al.* (1975), que otimizaram a metodologia aplicada na limpeza clonal de espécies de Citrus.

De maneira geral, os eventos que precedem a formação de uma união compatível na enxertia consistem no alinhamento entre o câmbio vascular do enxerto e do porta-enxerto; na adesão entre as partes enxertadas mediante a proliferação e entrelaçamento de células na região de interface e na diferenciação de um câmbio vascular que se conectará com o câmbio original do porta-enxerto, a partir do qual os tecidos vasculares secundários se diferenciarão (Moore, 1984; Errea *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1997). Asante e Barnett (1997), Ermel *et al.* (1997), Troncoso *et al.* (1999) e Estrada-Luna *et al.* (2002) caracterizam o desenvolvimento de uma camada de células necrosadas delimitando a região injuriada, como sendo o estágio anterior à proliferação do calo na região de conexão.

De acordo com Navarro (1988) e Paz e Pasqual (1998), a enxertia *in vitro* envolve quatro etapas principais, caracterizadas como a obtenção do porta-enxerto, obtenção e preparo do enxerto, execução da enxertia e a aclimatização da planta enxertada.

Entretanto, para que se obtenha êxito na enxertia *in vitro*, é preciso que certos fatores tais como condições de incubação do porta-enxerto, idade do porta-enxerto, tamanho do enxerto e habilidade manual do enxertador sejam considerados. Caso a enxertia tenha a finalidade de limpeza clonal, deve-se considerar ainda o patógeno a ser eliminado (Paz e Pasqual, 1998).

Geralmente, os porta-enxertos utilizados são obtidos de sementes germinadas *in vitro*, podendo ainda, proceder de estacas enraizadas ou de gemas alongadas pela propagação *in vitro* (George, 1993; Hartmann *et al.*, 1997).

Hartmann *et al.* (1997) sugerem alguns aspectos positivos da utilização de plântulas oriundas de sementes como porta-enxertos, principalmente por se tratar de um processo de produção simples e de custo reduzido. Aliado a isso, muitas

plântulas não retêm vírus que freqüentemente ocorrem na planta-matriz, podendo o sistema radicular desenvolvido ser aproveitado, uma vez que fornece o suporte requerido para a planta enxertada. No entanto, a variabilidade genética observada entre esses propágulos pode conduzir a diferenças de resposta quanto ao crescimento e desenvolvimento do enxerto.

Buscando minimizar esses efeitos, o uso de material clonal (estacas enraizadas ou gemas alongadas obtidas a partir da multiplicação vegetativa *in vitro*) como porta-enxertos apresenta-se como alternativa para aquelas espécies que demonstram dificuldades na produção de sementes viáveis, bem como limitações quanto ao conhecimento da procedência. Além disso, os porta-enxertos obtidos de propágulos vegetativos proporcionam uniformidade e manutenção das características desejáveis (Jonard, 1986), merecendo destaque a transmissão de resistência a certas doenças (Hartmann *et al.*, 1997), além da influência que exercem sobre o crescimento e desenvolvimento dos enxertos.

Esta técnica tem sido aprimorada e cada vez mais utilizada na propagação vegetativa de algumas espécies frutíferas (Pliego-Alfaro e Murashige, 1987; Abousalim e Mantell, 1992; Paiva *et al.*, 1993; Mukhopadhyay *et al.*, 1997; Ramanayke e Kovoov, 1999; Errea *et al.*, 2001; Mneney e Mantell, 2001; Thimmappaiah e Puthra, 2002; Channuntapipat *et al.*, 2003), florestais (Monteuuis, 1994; Kretschmar e Ewald, 1994; Perrin *et al.*, 1994; Monteuuis, 1995; Ewald e Kretschmar, 1996; Zaczek e Steiner, 1997), bem como de certas plantas ornamentais (Estrada-Luna *et al.*, 2002).

Um dos grandes problemas enfrentados no cultivo *in vitro* da maioria das espécies de plantas, que se constitui num desafio para os pesquisadores desta área, é a contaminação endógena dos propágulos. Dessa forma, o cultivo de ápices caulinares por meio da enxertia *in vitro* pode ser uma alternativa viável para a limpeza clonal, principalmente em espécies lenhosas, em situações nas quais, deseja-se manter as características das plantas adultas, mas cujos explantes meristemáticos têm se mostrado morfogeneticamente inábeis para formar plantas ou quando as partes aéreas formadas não enraizam adequadamente (Grattapaglia e

Machado, 1998).

Além de permitir a obtenção de plantas isentas de vírus e outras doenças, a enxertia *in vitro* pode contribuir para estudos relacionados com a incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, e com os aspectos fisiológicos e histológicos envolvidos neste processo (Jonard, 1986; George, 1993; Hartmann *et al.*, 1997). Herrero (1951), Yeomann e Brown (1976), Moore e Walker (1981a), Moore e Walker (1981b), Moore (1984), Gebhardt e Goldbach (1988), Errea *et al.* (1994), Asante e Barnett (1997), Barnett e Weatherhead (1988) e Ermel *et al.* (1997) mencionam a aplicação da enxertia *in vitro* em estudos pertinentes à formação da união de enxertos compatíveis e incompatíveis.

A enxertia de árvores frutíferas, por exemplo, compreende a utilização de um porta-enxerto que fornece o sistema radicular e de um enxerto que normalmente é obtido de uma planta agronomicamente superior. Apesar disto, é freqüente a ocorrência de incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, principalmente em combinações interespecíficas de algumas espécies. A incompatibilidade é um evento biológico, cujos efeitos podem manifestar-se precocemente ou anos após a realização da enxertia. Portanto, é necessário que ocorra uma conexão vascular contínua na interface da união entre enxerto e porta-enxerto (Errea *et al.*, 2001), dentre outros aspectos. Por intermédio da enxertia *in vitro*, podem-se constatar precocemente, problemas dessa ordem, particularmente em plantas que não mostrem com rapidez, os sintomas de incompatibilidade (Jonard, 1986; Moore, 1991; Errea *et al.*, 1994).

Paz e Pasqual (1998) citam, ainda, algumas vantagens da enxertia *in vitro*, dentre as quais destacam-se a formação de bancos de plantas matrizes para fornecimento de borbulhas certificadas a produtores de mudas; a possibilidade de intercâmbio de mudas, assegurando seu ótimo estado fitossanitário; a manutenção de bancos de germoplasma livres de vírus; a possibilidade de aumentar a produtividade nos plantios comerciais e tratando-se de essências florestais, o rejuvenescimento dos propágulos quando feita de forma seriada.

### 2.3. Enxertia *in vitro* em espécies lenhosas

As técnicas de propagação vegetativa, adotando-se como ferramenta a cultura de tecidos, tornaram-se uma importante estratégia para o melhoramento genético de diferentes espécies. Neste contexto, alguns trabalhos, utilizando a enxertia *in vitro*, vêm sendo conduzidos, especialmente em espécies lenhosas de interesse comercial, como algumas fruteiras e essências florestais de importância econômica.

Dentre os principais argumentos para a propagação clonal pela enxertia *in vitro* estão a possibilidade de introduzir explantes livres de contaminações através de ápices meristemáticos obtidos de genótipos adultos, visando estimular o potencial de clonagem de materiais selecionados, o rejuvenescimento em essências florestais, quando feita de forma seriada e a condução de estudos relacionados ao fenômeno da incompatibilidade entre enxertos e porta-enxertos.

Monteuuis (1995), trabalhando com a enxertia *in vivo* e *in vitro* de explantes adultos e juvenis de *Acacia mangium*, comenta sobre a dificuldade de clonagem de material adulto desta espécie pelo enraizamento de estacas, mencionando a importância da enxertia *in vitro*, como ferramenta para a propagação não destrutiva de árvores adultas selecionadas. Com o uso da enxertia *in vitro*, este autor conseguiu elevar o número de enxertos estabelecidos, utilizando materiais juvenis e adultos, enquanto por meio da enxertia *in vivo*, obteve sucesso apenas com o uso de explantes juvenis. Este autor considera que a enxertia *in vitro* parece neutralizar o impacto da idade ontogenética da árvore matriz doadora dos propágulos, uma vez que as plantas enxertadas *in vitro*, utilizando enxertos de materiais adultos e juvenis, não apresentaram diferenças de respostas de calejamento e pegamento dos enxertos.

Aplicações da enxertia *in vitro*, visando o rejuvenescimento de algumas espécies de plantas, são descritas por diversos autores. Pliego-Alfaro e Murashige (1987) e Zaczek e Steiner (1997) relataram a grande dificuldade de enraizamento de estacas de propágulos adultos para certas espécies. No entanto, os resultados obtidos em seus trabalhos mediante o uso da enxertia *in vitro* com explantes coletados de

plantas adultas mostraram a restauração da competência ao enraizamento para *Persea americana* e *Quercus rubra*, respectivamente.

Huang *et al.* (1992) citam que sucessivas enxertias *in vitro*, em curtos intervalos de tempo a partir de ápices meristemáticos extraídos de tecidos adultos de *Sequoia sempervirens*, restauraram características juvenis mais rapidamente, podendo esta técnica ser aplicada com o propósito de rejuvenescimento.

Kretzschmar e Ewald (1994) também apresentaram em seus resultados, perspectivas da utilização da enxertia *in vitro* com explantes meristemáticos para a propagação vegetativa de tecidos adultos de *Larix decidua*. Ewald e Kretzschmar (1996) em trabalho com a mesma espécie, compararam o comportamento da micropropagação de brotações desenvolvidas em casa de vegetação, obtidas a partir de plantas enxertadas *in vitro* aos cinco meses de idade, com brotações oriundas do cultivo *in vitro* de gemas axilares da mesma planta doadora adulta. Observaram que os primeiros explantes se multiplicaram mais rapidamente em relação aos cultivados via gemas axilares. Experimentos de enraizamento de estacas dos clones enxertados *in vitro* resultaram em 50% de enraizamento, enquanto estacas de plantas matrizes adultas não mostraram formação de raízes. Estes resultados confirmam a influência do rejuvenescimento por meio da enxertia *in vitro*, em explantes oriundos de árvores adultas de *Larix*.

Mnoney e Mantell (2001) comentam que *Anacardium occidentale*, tratando-se de uma espécie recalcitrante ao cultivo *in vitro*, apresenta dificuldades quanto ao enraizamento adventício, a partir de material adulto. Mediante a aplicação da enxertia *in vitro*, utilizando porta-enxertos juvenis oriundos de sementes germinadas em condições assépticas e, como enxertos, propágulos de árvores adultas, esses autores conseguiram 13,3% de enraizamento nas brotações obtidas das plantas enxertadas. Este resultado foi atribuído ao rejuvenescimento parcial desses tecidos. Um maior número de enxertias seriadas, utilizando essas brotações, poderia contornar esse problema, aumentando os índices de enraizamento (Jonard, 1986; Huang *et al.*, 1992).

Em trabalho com a enxertia *in vitro* de *Picea abies*, Monteuis (1994)

avaliou a influência da técnica e da irradiância, obtendo resultados positivos em termos de conexão dos enxertos quando as plantas enxertadas permaneceram por 14 a 21 dias no escuro, após a realização da enxertia. Entretanto, verificou alta variabilidade no alongamento das brotações entre as plantas enxertadas *in vitro*, bem como após a transferência das mesmas para as condições *ex vitro*.

Na enxertia *in vitro* de *Anacardium occidentale*, o uso de ácido cítrico controlou a oxidação nas regiões excisadas dos porta-enxertos e enxertos. O pré-tratamento dos enxertos com ácido indolacético, seguido do cultivo em meio de cultura contendo ácido naftalenoacético, indicou a necessidade da aplicação de auxinas para que ocorressem a união, desenvolvimento e enraizamento das plantas enxertadas (Ramanayake e Kovoov, 1999).

Thimmappaiah e Puthra (2002), também trabalhando com a enxertia *in vitro* da mesma espécie e utilizando enxertos extraídos de árvores adultas, descrevem o uso de meio líquido, reduzido à metade da concentração dos sais nutrientes de MS (Murashige e Skoog, 1962) e ponte de papel como suporte, para o estabelecimento das plantas enxertadas. Inicialmente, essas plantas foram submetidas por 7 dias à baixa irradiância ( $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), sendo esta alterada para 45 a  $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sob regime luminoso de 16 horas luz/8 horas escuro. Neste trabalho, o sucesso desta técnica foi dependente do método de enxertia *in vitro* adotado, bem como do tamanho do enxerto utilizado. Resultados positivos foram obtidos com enxertos apresentando tamanho superior a 5 mm de comprimento. O pré-tratamento dos enxertos com uma solução de ácido ascórbico e ácido cítrico contribuiu para a redução da oxidação fenólica e desidratação desses explantes. Navarro (1988) contraria em parte, essas afirmações, relatando que a agilidade no manuseio dos explantes durante a execução da enxertia é um dos fatores que podem evitar a oxidação fenólica e a rápida desidratação dos tecidos de maneira mais efetiva, se comparados com a utilização de substâncias antioxidantes.

Diante da dificuldade em se obterem plantas de Citrus livres de vírus por meio do cultivo de ápices caulinares, Murashige *et al.* (1972) desenvolveram a técnica de enxertia *in vitro*, obtendo-se baixos percentuais (5-40%) de sobrevivência



das plantas. Apesar disto, esses resultados mostraram-se promissores, principalmente pelo fato de as plantas enxertadas obtidas, terem mostrado a conservação das características de uma planta adulta, não tendo sido revertidas à juvenilidade.

Navarro *et al.* (1975) estudaram alguns fatores que podem exercer influência quanto ao sucesso de pegamento dos enxertos, destacando as características associadas ao porta-enxerto, tais como as cultivares empregadas e os fatores que interferem no comportamento dos porta-enxertos obtidos de plântulas germinadas *in vitro* (germinação na presença e na ausência de luz e a idade das plântulas), o tamanho dos explantes utilizados, a fonte da qual foram extraídos os ápices meristemáticos, as cultivares utilizadas como enxertos e os patógenos presentes nestes tecidos e o manejo das plantas enxertadas, após a realização da enxertia. Os resultados obtidos indicaram a recuperação de plantas isentas de patógenos, com 95% de sobrevivência após a transferência das plantas para o solo, realizada 35 a 40 dias após a enxertia.

Paiva *et al.* (1993) e Mukhopadhyay *et al.* (1997) também usaram a enxertia *in vitro* para a limpeza clonal de plantas cítricas. Na metodologia descrita por Paiva *et al.* (1993), após a inserção do enxerto no corte em “T invertido” feito no ápice do porta-enxerto germinado *in vitro*, a plântula enxertada foi inoculada em meio de cultura líquido e mantida em câmara de crescimento, até que a brotação do enxerto formasse duas folhas. Em seguida, foi realizada a transferência das mesmas para vasos, visando a aclimatização.

Mukhopadhyay *et al.* (1997) obtiveram êxito, submetendo plântulas de *Citrus reticulata* enxertadas *in vitro* ao escuro total durante os quatro primeiros dias após a realização da enxertia, seguidos pela exposição a níveis diferenciados de irradiância. Segundo esses autores, o sucesso da enxertia *in vitro* foi influenciado pela idade e espécie dos porta-enxertos utilizados.

Em trabalho com *Opuntia* spp., Estrada-Luna *et al.* (2002) avaliaram a enxertia *in vitro* para cinco espécies de porta-enxerto e uma de enxerto, buscando encontrar combinações compatíveis e incompatíveis. Os eventos histológicos que

ocorrem durante os estádios de formação da união dos enxertos foram o desenvolvimento de uma camada necrosada, a proliferação do calo na interface de união entre enxerto e porta-enxerto, a diferenciação do novo câmbio vascular e a restauração dos novos tecidos vasculares e da continuidade dos tecidos epidérmicos na zona de união. Esses autores comentam ainda, sobre o potencial de uso desta técnica para a propagação comercial de outras espécies de cactus, uma vez que não ocorreram problemas de contaminação ou desidratação dos enxertos e devido a não necessidade da utilização de estruturas especiais como adesivos para que houvesse a união do enxerto.

Errea *et al.* (2001) estudaram o uso de tecidos de calos de *Prunus armeniaca*, visando estabelecer um método para a detecção precoce de enxertias incompatíveis pela junção de calos *in vitro*. Foram avaliados a adesão dos calos em contato, o desenvolvimento de células nesta superfície, e a presença de compostos lipídicos e fenólicos durante as três primeiras semanas após o co-cultivo dos calos, em ambas as combinações compatíveis e incompatíveis. O comportamento dos enxertos cultivados *in vitro* foi correlacionado com aquele apresentado pelas mesmas combinações em campo, sugerindo que o entrelaçamento de células do calo *in vitro* pode ser um método confiável para a rápida detecção de incompatibilidade em diferentes combinações de *Prunus*.

Errea *et al.* (1994), também em estudo sobre a compatibilidade em diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto em *Prunus*, descrevem o processo de estabelecimento da união do enxerto e afirmam que a proliferação e a diferenciação do calo bem como a reconexão vascular foram estabelecidas de maneira similar tanto nas combinações compatíveis, quanto nas incompatíveis. No entanto, esses autores observaram diferenças evidentes quanto ao nível de diferenciação do calo formado. Em enxertos compatíveis, alguns tipos celulares do calo rapidamente se diferenciam em câmbio e tecido vascular, enquanto em combinações incompatíveis, esta diferenciação é incompleta, tendo uma porção do tecido do calo envolvida por faixas de células parenquimáticas, que interrompem a continuidade vascular entre as partes enxertadas, produzindo uma conexão fragilizada dos enxertos. Esses

resultados confirmam o potencial de aplicação da enxertia *in vitro* para a detecção precoce de incompatibilidade entre diferentes combinações, haja visto que esses eventos são observados nos primeiros estádios após a realização da enxertia.

Em *Eucalyptus*, a enxertia *in vitro* apresenta potencial de aplicação no que concerne à propagação clonal de certas espécies que apresentam dificuldades quanto às demais técnicas de propagação vegetativa. Aliado a isso, esta técnica pode ser utilizada para a limpeza clonal, rejuvenescimento de clones adultos de interesse comercial, bem como em associação a programas de hibridação e formação de pomares de sementes de indivíduos superiores. No entanto, em razão da escassez de trabalhos contemplando sua utilização na área florestal, justifica-se o desenvolvimento de estudos, visando a avaliação de sua eficiência na obtenção de mudas clonais em espécies do gênero *Eucalyptus*.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSALIM, A.; MANTELL, S. H. Micrografting of pistachio (*Pistacea vera* L. cv. Mateur). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 29, p. 231-234, 1992.

ASANTE, A. K.; BARNETT, J. R. Graft union formation in mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Horticultural Science**, v. 72, n. 5, p. 781-790, 1997.

ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTUS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997. v. 1, p. 300-304.

BARNETT, J. R.; WEATHERHEAD, I. Graft formation in sitka spruce: a scanning electron microscope study. **Annals of Botany**, v. 61, p. 581-587, 1988.

BONGA, J. M. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, p. 249-271, 1987.

BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.

CHAPERON, H. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: SIMPOSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPECIES FORESTALES, 1987, Buenos Aires, Argentina. **Anales ...[S.l.]**: AFOCEL, 1987. p.215-232.

CHANNUNTAIPAT, C.; SEDGLEY, M.; COLLINS, G. Micropropagation of almond cultivars nonpareil and ne plus ultra and the hybrid rootstock titan x nemaguard. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 473-484, 2003.

COMÉRIO, J.; XAVIER, A.; IANNELLI, C. M. Microestaquia: um novo sistema de produção de mudas de *Eucalyptus* na Champion. In: ENCONTRO TÉCNICO FLORESTAL, 7, 1996, Belo Horizonte. **Anais ...** Piracicaba, SP: ABRACAVE, 1996. 6 p.

DURAND-CRESWELL, R.; BOULAY, M.; FRANCLLET, A. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Tissue culture in forestry**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1982. p.150-181.

ERMEL, F. F.; POESSEL, J. L.; FAUROBERT, M.; CATESSON, A. M. Early scion/stock junction in compatible and incompatible pear/pear and pear/quince grafts: a histo-cytological study. **Annals of Botany**, v. 79, p. 505-515, 1997.

ERREA, P.; FELIPE, A.; HERRERO, M. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 272, p. 393-401, 1994.

ERREA, P. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. **Scientia Horticulturae**, v. 74, p. 195-205, 1998.

ERREA, P.; GARAY, L.; MARÍN, J. A. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 135-141, 2001.

ESTRADA-LUNA, A. A.; LÓPEZ-PERALTA, C.; SORIANO-CÁRDENAS, E. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). **Scientia Horticulturae**, v. 92, p. 317-327, 2002.

EWALD, D.; KRETZSCHMAR, U. The influence of micrografting *in vitro* on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 249-252, 1996.

GEBHARDT, K.; GOLDBACH, H. Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. **Physiologia Plantarum**, v. 72, p. 153-159, 1988.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2nd. ed. England: Exegetics, 1993, v. 1. 575 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI / EMBRAPA – CNPH, 1998. v. 1, p. 183–260.

GREENWOOD, M. S.; HUTCHISON, K. W. Maturation as a development process. In: AHUJA, M. R.; LIBBY, W. J. (Eds.). **Clonal forestry: genetics and biotechnology**. Budapest: Springer-Verlag, 1993. p. 14-33.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.

HERRERO, J. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. **Journal of Horticultural Science**, v. 26, n. 3, p. 186-237, 1951.

HUANG, L. C.; LIUS, S.; HUANG, B. L.; MURASHIGE, T.; MAHDI, E. F. M.; VAN GUNDY, R. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. **Plant Physiology**, v. 98, p. 166-173, 1992.

JONARD, R. Micrografting and its applications to tree improvement. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed), **Biotechnology in agriculture and forestry. v. 1: trees**. Springer-Verlag, Berlin, p. 31-48, 1986.

KRETZSCHMAR, U.; EWALD, D. Vegetative propagation of 140-year-old *Larix decidua* trees by different *in vitro* techniques. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 627-630, 1994.

MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. *In vitro* micrografting of cashew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 49-58, 2001.

MONTEUUIS, O. Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*. **Silvae Genetica**, v.43, n. 2-3, p. 91-95, 1994.

MONTEUUIS, O. *In vivo* grafting and *in vitro* micrografting of *Acacia mangium*: impact of ortet age. **Silvae Genetica**, v. 44, n. 4, p. 190-193, 1995.

MOORE, R. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. **American Journal of Botany**, v. 71, n. 5, p. 752-758, 1984.

MOORE, R. Graft compatibilities *in vitro*. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry. v. 17: high-tech and micropropagation I**. Springer-Verlag, Berlin, p. 71-84, 1991.

MOORE, R.; WALKER, B. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograft in *Sedum telephoides* (crassulaceae). **American Journal of Botany**, v. 68, n. 6, p. 820-830, 1981a.

MOORE, R.; WALKER, B. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. II. A structural study of an incompatible heterograft between *Sedum telephoides* (crassulaceae) and *Solanum pennellii* (solanaceae). **American Journal of Botany**, v. 68, n. 6, p. 831-842, 1981b.

MUKHOPADHYAY, S.; JAISHREE RAI, B. C.; SHARMA, A. G.; SENGUPTA, R. K.; NATH, P. S. Micropropagation of darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting. **Journal of Horticultural Science**, v. 72, n. 3, p. 493-499, 1997.

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

MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. **HortScience**, v. 7, n. 2, p. 118-119, 1972.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 100, n. 5, p. 471-479, 1975.

NAVARRO, L. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to wood species. **Acta Horticulturae**, v. 227, p. 43-55, 1988.

OLIVEIRA, M. L. **Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus* spp.** Viçosa, MG: UFV, 2003, 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

PAIVA, L. V.; CARVALHO, S. A.; SOUZA, M. Limpeza clonal da laranjeira “seleta folha murcha” através da microenxertia *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 1341-1344, 1993.

PAZ, O. P.; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA – SPI / EMBRAPA – CNPH, 1998. v. 1, p. 147-160.

PERRIN, Y.; LARDET, L.; ENJALRIC, F.; CARRON, M. P. Rejuvenation of mature clones of *Hevea brasiliensis* by *in vitro* micrografting. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 74, n. 3, p. 623-630, 1994.

PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. **HortScience**, v. 22, n. 6, p. 1321-1324, 1987.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; KOOVOR, A. *In vitro* micrografting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 265-268, 1999.

THIMMAPPAIAH, S. R. A.; PUTHRA, G. T. *In vitro* grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, v.92, p. 177-182, 2002.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

TRONCOSO, A.; LINAN, J.; CANTOS, M.; ACEBEDO, M. M. Feasibility and anatomical development of an *in vitro* olive cleft-graft. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 584-587, 1999.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.20, n.1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa, MG: SIF, 1998. 10p. (Informativo Técnico SIF, 11).

XAVIER, A.; ANDRADE, H. B.; OLIVEIRA, M. L.; WENDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I: Princípios e técnicas de propagação vegetativa**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 64p. (Caderno Didático, 92).

YEOMAN, M. M.; BROWN, R. Implications of the formation of the graft union for organisation in the intact plant. **Annals of Botany**, v. 40, p. 1265-1276, 1976.

ZACZEK, J. J.; STEINER, K. C. Grafting-mediated meristem selection influences rooting success of *Quercus rubra*. **Canadian Journal of Forestry Resources**, v. 27, p. 86-90, 1997.

ZOBEL, B. J. Clonal forestry in the eucalypts. In: AHUJA, M. R., LIBBY, W. J. (Eds.). **Clonal forestry: conservation and application**. Budapest: Springer-Verlag, 1993. p. 139-148.



## **ENXERTIA *IN VITRO* NA PROPAGAÇÃO DE CLONES DE *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis***

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo, avaliar a eficiência da enxertia *in vitro* na propagação de dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. Foram utilizados porta-enxertos juvenis obtidos de sementes de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* germinadas *in vitro*. As plantas enxertadas apresentaram percentuais de pegamento de até 93% aos 50 dias de idade para as combinações de enxerto e porta-enxerto. Quanto ao crescimento em altura, verificaram-se, de maneira geral, melhores resultados em relação ao porta-enxerto *E. urophylla*. A análise histológica revelou que o processo de cicatrização do calo formado na região de conexão, seguida da reconstituição vascular, ocorreu aos 14 dias após a realização da enxertia *in vitro*.

**Palavras-chave:** propagação clonal, enxertia *in vitro*, cultura de tecidos.

## ***IN VITRO* GRAFTING IN THE PROPAGATION OF *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis* CLONES**

ABSTRACT – The objective of this work was to evaluate the efficiency of the *in vitro* grafting in the propagation of two *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis* hybrid clones. Juvenile stocks obtained from seeds of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* germinated *in vitro* were used. The grafted plants showed success percentages up to 93% at 50 days for the scion and stock combinations. For the height growth it was observed that the best results occurred mostly when the stock was *E. urophylla*. The histologic analysis showed that the cicatrization process of the callus formed in the connection region followed by the vascular recomposition occurred at 14 days after the *in vitro* grafting.

**Keywords:** clonal propagation, *in vitro* grafting, tissue culture.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* tem merecido destaque cada vez maior no setor econômico brasileiro por se tratar de uma espécie de rápido crescimento e cuja produtividade em campo atinge níveis significativos, em razão dos avançados programas de melhoramento desenvolvidos em diversas empresas florestais, principalmente aquelas que atuam junto ao setor de celulose e papel.

Neste âmbito, a Silvicultura clonal intensiva para as espécies deste gênero tem ocupado papel relevante no cenário florestal, permitindo a implementação de florestas de eucalipto em áreas anteriormente consideradas inadequadas, em função das limitações de material genético, via semínifera. Ademais, a utilização de clones possibilita a formação de povoamentos altamente produtivos e homogêneos e, como consequência, obtêm-se a racionalização das atividades operacionais e a melhoria da qualidade da madeira (Oliveira, 2003). A estaquia tem sido a técnica mais difundida na propagação clonal, por ser de fácil aplicação e dada a sua rusticidade operacional. Entretanto, essa técnica apresenta-se inviável para clones de difícil enraizamento, sendo este fenômeno atribuído ao grau de maturação dos propágulos utilizados. Com o desenvolvimento da microestaquia e miniestaquia, estas técnicas proporcionaram melhorias no processo de produção de mudas, principalmente quanto ao enraizamento de alguns clones. Entretanto, existem alguns materiais genéticos de difícil propagação clonal, considerados recalcitrantes, inclusive quando cultivados pela micropropagação de gemas axilares, justificando, portanto, alternativas que tornem possível os benefícios do rejuvenescimento *in vitro*.

Dessa forma, a enxertia *in vitro* apresenta-se como uma estratégia para a propagação clonal de árvores adultas de *Eucalyptus*, com potencial de aplicação no rejuvenescimento de clones, conforme sugerido em trabalhos com espécies frutíferas (Pliegro-Alfaro e Murashige, 1987); e florestais (Huang *et al.*, 1992; Kretschmar e Ewald, 1994; Perrin *et al.*, 1994; Ewald e Kretschmar, 1996).

Esta técnica, inicialmente estabelecida por Murashige *et al.* (1972) para plantas cítricas, consiste em enxertar, sob condições assépticas, um meristema ou

ápice caulinar obtido de plantas adultas sobre porta-enxertos oriundos de sementes germinadas *in vitro*.

Resultados satisfatórios da utilização de enxertia *in vitro* na propagação clonal de algumas espécies frutíferas e florestais são mencionados por Kretzschmar e Ewald (1994); Monteuuis (1994); Monteuuis (1995); Ramanayake e Kovoov (1999); Troncoso *et al.* (1999); Mneney e Mantell (2001) e Thimmappaiah e Puthra (2002). Paiva *et al.* (1993) e Mukhopadhyay *et al.* (1997) obtiveram sucesso na obtenção de plantas de Citrus livres de vírus, dentre outros patógenos, enfatizando a eficiência da enxertia *in vitro* na limpeza clonal dessas plantas. Além disso, diversos trabalhos têm sido conduzidos, envolvendo a aplicação da enxertia *in vitro* em estudos pertinentes à rápida detecção da incompatibilidade em diferentes espécies (Moore 1984; Gebhardt e Goldbach, 1988; Errea *et al.*, 1994; Ermel *et al.*, 1997; Errea, 1998; Errea *et al.*, 2001; Estrada-Luna *et al.*, 2002).

Desta forma, considerando o potencial desta técnica e a carência de estudos envolvendo a enxertia *in vitro* em espécies do gênero *Eucalyptus*, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência da enxertia *in vitro*, na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* provenientes da empresa V&M Florestal LTDA e sementes de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, provenientes de Área de Produção de Sementes, localizada na região de Mogi Guaçu – SP, da empresa International Paper do Brasil.

Inicialmente, os clones foram propagados vegetativamente pela estaquia, sendo posteriormente estabelecidos *in vitro*, mediante o cultivo de segmentos nodais, seguido de sucessivos subcultivos durante a fase de multiplicação via proliferação de gemas axilares, visando o seu rejuvenescimento. O meio de cultura adotado na fase de multiplicação foi constituído pelos sais minerais de de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de White (White, 1943), ágar granulado

Merck<sup>®</sup> (5 g L<sup>-1</sup>), 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP (6-benzilaminopurina) e 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético), com o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . As condições de incubação foram à temperatura de  $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ , fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e irradiância de  $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (fornecida por tubos fluorescentes, “luz do dia”, Osram<sup>®</sup>, 20 Watts).

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa.

O presente trabalho foi composto de duas etapas, sendo a primeira referente à germinação de sementes *in vitro* de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, para a obtenção dos porta-enxertos e produção de gemas alongadas *in vitro* de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* para a obtenção dos ápices caulinares utilizados como enxertos. A segunda etapa constituiu-se da realização da enxertia *in vitro*.

## 2.1. Obtenção e preparo dos porta-enxertos

Inicialmente, as sementes de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* foram lavadas em água desionizada e autoclavada e, sob condições assépticas, desinfestadas em solução de álcool etílico 70% v/v por 1 minuto e imersas em solução de hipoclorito de sódio 5% v/v do produto comercial (Kintana<sup>®</sup>), durante 15 minutos. Em seguida, foram enxaguadas sucessivamente, 6 vezes em água desionizada, autoclavada e inoculadas em meio WPM (Lloyd e McCown, 1981) na concentração total dos sais, acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP (polivinilpirrolidona), vitaminas WPM, sem reguladores de crescimento. Como agente gelificante, foram utilizados 5 g L<sup>-1</sup> de ágar granulado Merck<sup>®</sup>, fundido durante o processo de autoclavagem do meio de cultura. O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  (antes da adição do ágar) e após, foi realizada a autoclavagem a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , pressão de  $1,0 \text{ Kg cm}^{-2}$  durante 20 minutos.

Visando controlar a contaminação endofítica, foram acrescidos ao meio nutritivo, 300 mg L<sup>-1</sup> do antibiótico ticarcilina (Timentim<sup>®</sup>), previamente esterilizado por filtração em membranas Milipore<sup>®</sup> (0,20 µM de póro) e adicionado ao meio, em câmara de fluxo laminar, após a sua autoclavagem.

Sob condições assépticas, foram inoculadas 10 sementes por frasco de cultivo (60 mm x 100 mm), contendo 40 mL de meio de cultura. Após a semeadura, os frascos foram vedados com filme transparente de PVC (Rolopac<sup>®</sup>).

Após a inoculação das sementes nos frascos de cultivo, estes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27 °C ± 1 e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e irradiância de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (fornecida por tubos fluorescentes, “luz do dia”, Osram<sup>®</sup>, 20 Watts).

No preparo dos porta-enxertos, sob condições assépticas e com auxílio de lupa binocular (Olympus, SZ60) com aumento de 10 vezes, as plântulas germinadas *in vitro*, apresentando 45 a 60 dias de idade e aproximadamente 2,0 cm de altura (Figura 1a), foram colocadas sobre papel de filtro umedecido com água desionizada estéril, sendo decapitadas no ponto imediatamente abaixo do par de folhas cotiledonares (Figura 1d). Dessa forma, os porta-enxertos preparados com base no hipocótilo apresentavam aproximadamente 1,5 cm de altura.

Durante a manipulação dos porta-enxertos, excisou-se uma porção terminal do sistema radicular desses explantes, que foi retirada de modo a facilitar a inoculação desse material vegetal nos tubos de ensaio após a enxertia *in vitro*. Em seguida, foi realizada a abertura da fenda no porta-enxerto, visando receber o enxerto.

## **2.2. Obtenção e preparo dos enxertos**

Para a obtenção dos ápices caulinares, foi utilizada a técnica de micropropagação via gemas axilares, conforme descrito anteriormente, sendo a modificação feita apenas com relação a concentração dos reguladores de crescimento no meio nutritivo para 0,05 mg L<sup>-1</sup> BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA e 0,1 mg L<sup>-1</sup>

BAP e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ANA para os clones 1 e 2, respectivamente. A alteração do meio de cultura teve como finalidade, promover o alongamento das partes aéreas multiplicadas em banco clonal. As condições de temperatura e fotoperíodo dentro da sala de crescimento permaneceram as mesmas já descritas no item 2.1.



**Figura 1** - Enxertia *in vitro* em clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. (A) plântulas de *Eucalyptus* germinadas *in vitro* aos 45 dias de idade (Barra = 10 mm); (B) gemas alongadas *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* micropropagados, aos 30 dias de cultivo em meio de alongamento (Barra = 12 mm); (C) detalhe do ápice caulinar com o corte em bisel na base (Barra = 5 mm); (D) detalhe do porta-enxerto (hipocótilo com raiz) após a decapitação da parte aérea (Barra = 8 mm); (E) planta enxertada imediatamente após a enxertia *in vitro* (Barra= 12 mm).

A partir das gemas alongadas *in vitro* dos dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, com 30 dias de cultivo (Figura 1b), foram extraídos os ápices caulinares, apresentando aproximadamente 1 cm de comprimento e dois a três pares de folhas totalmente expandidas (Figura 1c).

Sob lupa binocular (Olympus, SZ60), com aumento de 10 vezes, as gemas alongadas *in vitro* foram retiradas dos frascos e colocadas sobre papel de filtro

umedecido com água desionizada e autoclavada e, em seguida, foi realizado o corte em duplo bisel na porção basal do ápice caulinar.

### **2.3. Enxertia *in vitro***

Após o devido preparo do porta-enxerto e do enxerto, em condições assépticas, sob lupa binocular e com o auxílio de pinças, foi realizada a união de ambas as partes (Figura 1e). Em seguida, as plantas enxertadas foram inoculadas em meio de cultura constituído dos sais minerais de MS em sua concentração total, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, vitaminas de White, sem a adição de reguladores de crescimento. Após ajustar o pH em  $5,7 \pm 0,1$ , foi adicionado 5 g L<sup>-1</sup> de ágar granulado Merck<sup>®</sup>, fundido em forno de microondas e incorporado ao meio antes do processo de autoclavagem. As plantas enxertadas *in vitro* foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) vedados com tampas de polipropileno, sendo adicionados a cada tubo de ensaio, 10 mL de meio nutritivo.

As plantas enxertadas foram acondicionadas em sala de cultura com condições ambientais de  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ , submetidas a tratamentos referentes ao tempo de permanência em regime de escuridão, após a realização da enxertia. O tratamento T1 foi o controle, correspondendo a 0 dias no escuro; o T2, a 7 dias no escuro; o T3, a 14 dias no escuro e o T4 correspondendo a 21 dias no escuro.

Decorrido o tempo de permanência no escuro referente a cada tratamento, as plantas foram submetidas ao mesmo fotoperíodo do tratamento controle T1(0 dias no escuro), ou seja, 16 horas de luz e 8 horas de escuro e irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Os experimentos foram instalados seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada planta enxertada, uma repetição.

## 2.4. Análise histológica

Para observar histologicamente os processos de cicatrização e reconstituição vascular das plantas enxertadas, foram coletadas amostras da região de união entre enxerto e porta-enxerto de plantas do clone 1, aos 7, 14, 21, 28 e 50 dias após a realização da enxertia.

Para a obtenção das amostras, foram utilizados os tratamentos com melhores resultados quanto à sobrevivência das plantas enxertadas após 50 dias de cultivo *in vitro*.

Foram retiradas aleatoriamente, quatro amostras por coleta, fixadas em FAA 50%, durante 48 horas, sob vácuo. Em seguida, essas amostras foram colocadas em álcool etílico 70 % v/v, onde permaneceram estocadas, sendo novamente submetidas a vácuo, por 24 horas.

As amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin<sup>®</sup>, Leica). Seções longitudinais de 8 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155-Leica), coradas em azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully, 1981), sendo as lâminas montadas em resina sintética (Permount<sup>®</sup>).

Foi realizado um teste histoquímico para lignina, visando a confirmação da diferenciação do tecido vascular, reconectando enxerto e porta-enxerto. Amostras da região de união de plantas com 43 dias de idade do clone 1 enxertadas em *E. grandis* foram coletadas e fixadas de acordo com o mesmo procedimento descrito neste item. Os cortes a mão livre foram obtidos utilizando-se micrótomo de mesa (LPC, Rolemberg e Bhering), tendo as seções sido coradas com Floroglucina Ácida (Jensen, 1962). As lâminas foram montadas e entre lâmina e lamínula, foi utilizada glicerina hidratada a 50%.

A documentação fotográfica das lâminas foi realizada utilizando-se o microscópio Olympus AX70, conectado a um sistema de fotomicrografia Olympus U-Photo do Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.



## 2.5. Avaliações

Aos 35 e 50 dias, foram realizadas avaliações das plantas enxertadas quanto ao percentual de pegamento do enxerto. Após 50 dias de realização da enxertia, avaliou-se também a altura das plantas enxertadas em relação aos quatro tratamentos de tempo de permanência no escuro, em função dos dois clones, nas duas espécies de porta-enxerto.

Foi adotado o critério de níveis nas avaliações de percentual de pegamento, sendo os mesmos caracterizados da seguinte maneira: nível 1 - ausência de conexão ou conexão frágil, apresentando ausência de calejamento ou calejamento intenso na região de união; nível 2 - conexão regular, caracterizada pelo desalinhamento lateral de uma das partes do enxerto e taxa de calejamento intensa e média e nível 3 - conexão excelente, na qual observou-se a total união entre os tecidos do enxerto e porta-enxerto, apresentando baixa intensidade de calejamento na região do enxerto.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Percentagem de pegamento das plantas enxertadas *in vitro*

Durante a etapa inicial de estabelecimento dos enxertos *in vitro*, percebe-se que os dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* responderam positivamente à enxertia *in vitro*, conforme pode ser observado no Quadro 1.

Em relação ao percentual de pegamento total após 35 dias de cultivo *in vitro*, foram observados, de maneira geral, valores elevados para os dois clones. O clone 1 apresentou respostas semelhantes em relação aos diferentes períodos de permanência das plantas no escuro após a enxertia e quanto aos porta-enxertos *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, atingindo até 99% de pegamento, no tempo de 7 dias no escuro, quando enxertado em *E. grandis*. Em relação ao porta-enxerto *E. urophylla*, o valor máximo de pegamento correspondeu a 93% nos tratamentos de 0 e 7 dias no escuro após a enxertia. O clone 2 apresentou neste mesmo período de

avaliação, até 100% de pegamento total em relação ao tempo de 7 dias no escuro, quando enxertado em *E. grandis*. Quanto ao porta-enxerto *E. urophylla*, da mesma forma, o maior valor foi observado no tempo de 7 dias de permanência das plantas no escuro, correspondendo a 93% de pegamento.

**Quadro 1** – Percentagem de pegamento das plantas enxertadas referente às combinações dos enxertos de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* com porta-enxertos de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, em função dos tratamentos de tempo de permanência no escuro (dias), avaliados aos 35 e 50 dias após a realização da enxertia *in vitro*.

Enxerto	Porta-enxerto	Dias no escuro	Percentagem de pegamento dos enxertos <i>in vitro</i> (%)							
			35 dias				50 dias			
			1	2	3	Total	1	2	3	Total
Clone 1	<i>E. urophylla</i>	0	20	40	33	<b>93</b>	7	27	53	<b>87</b>
		7	33	13	47	<b>93</b>	20	7	53	<b>80</b>
		14	0	20	60	<b>80</b>	0	20	60	<b>80</b>
		21	7	33	33	<b>73</b>	0	13	53	<b>66</b>
	<i>E. grandis</i>	0	13	40	27	<b>80</b>	7	27	40	<b>74</b>
		7	13	13	73	<b>99</b>	0	7	80	<b>87</b>
		14	13	27	53	<b>93</b>	7	13	67	<b>87</b>
		21	13	13	60	<b>86</b>	0	13	60	<b>73</b>
Clone 2	<i>E. urophylla</i>	0	0	27	60	<b>87</b>	0	27	60	<b>87</b>
		7	27	20	47	<b>93</b>	27	13	53	<b>93</b>
		14	20	7	47	<b>74</b>	7	7	47	<b>61</b>
		21	0	7	13	<b>20</b>	0	7	13	<b>20</b>
	<i>E. grandis</i>	0	0	13	73	<b>86</b>	0	7	80	<b>87</b>
		7	13	20	67	<b>100</b>	7	13	73	<b>93</b>
		14	20	0	27	<b>47</b>	13	0	27	<b>40</b>
		21	20	13	27	<b>60</b>	7	0	33	<b>40</b>

Níveis de pegamento: ausência de conexão ou conexão frágil (1), conexão regular (2), conexão excelente (3) e somatório das percentagens de pegamento dos níveis 1, 2 e 3 (Total).

Após 50 dias *in vitro*, observou-se para os dois clones, redução nos valores totais de pegamento, em função da mortalidade de algumas plantas enxertadas. Apesar disto, esses percentuais mantiveram-se elevados, atingindo para o clone 1, um máximo de 87% de pegamento nas duas espécies de porta-enxerto utilizadas. No porta-enxerto *E. urophylla*, este valor foi observado quando as plantas não foram expostas ao escuro (0 dias) e em *E. grandis*, nos tempos de 7 e 14 dias no escuro. O clone 2 obteve nos dois porta-enxertos, melhores respostas aos 7 dias de permanência das plantas no escuro, apresentando 93% de pegamento.

Comportamento contrário foi observado quanto ao maior tempo no escuro (21 dias), no qual os clones apresentaram percentuais inferiores, principalmente o clone 2, que obteve 20% de pegamento, quando enxertado sobre o porta-enxerto *Eucalyptus urophylla* e 40% sobre *E. grandis*. O clone 1 sofreu menor efeito em relação a este tratamento, obtendo melhores respostas, demonstradas por 66% de pegamento em porta-enxerto de *Eucalyptus urophylla* e 73% em porta-enxerto de *E. grandis*.

Em relação ao período intermediário de exposição das plantas ao escuro (14 dias), foram observados para os dois clones, após 50 dias de cultivo *in vitro*, percentuais ligeiramente inferiores, se comparados aos 7 dias. Essas respostas foram consideradas satisfatórias, principalmente para o clone 1, onde se observaram 80 e 87% de pegamento, quando enxertado sobre *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, respectivamente. Para o clone 2, foram observados menores índices, indicados por 61 e 40% de pegamento, em combinação com as mesmas espécies de porta-enxertos.

Os resultados obtidos indicaram para os dois clones, que o maior período de permanência das plantas enxertadas no escuro (21 dias) exerceu efeito negativo sobre o pegamento e a sobrevivência dos enxertos, ao final de 50 dias de cultivo. Isso pode ser atribuído ao prolongado tempo em que as plantas permaneceram na ausência de luz, fator que interfere indiretamente no processo de lignificação do xilema e estabelecimento final das plantas enxertadas (Wardrop, 1971). De acordo com esse autor, a falta de luz tem implicações na síntese de auxina, visto que este processo ocorre no ápice caulinar da parte aérea em crescimento e desenvolvimento, sendo dependente do estado fisiológico das folhas e responsável pelo estímulo da atividade cambial e diferenciação do tecido vascular. A lignificação da parede celular é considerada um dos principais eventos que conduzem à formação de uma união sólida nas plantas enxertadas (Feutch e Schmid, 1979). Segundo Taiz e Zeiger (1991), a regeneração do tecido vascular após uma lesão é controlada pela auxina produzida pela folha jovem, diretamente acima do local danificado.

Esses resultados contrariam Monteuis (1994) que, em trabalho com *Picea abies*, obteve resultados positivos, quando manteve as plantas enxertadas pelo mesmo período de tempo em regime de escuridão, logo após a enxertia. Segundo esse autor, estes resultados podem ser atribuídos ao efeito inibitório da degradação da auxina sintetizada nos ápices, que é fotossensível e mostra atuar positivamente sobre a reconstituição vascular dos enxertos, e também ao fato de a exposição à luz poder danificar os enxertos excisados, causando estresses irreparáveis e oxidação dos mesmos.

No que diz respeito ao estabelecimento dos enxertos *in vitro*, os valores percentuais obtidos em *Eucalyptus* encontram-se próximos aos observados para outras espécies lenhosas, a exemplo de Abousalim e Mantell (1992), Troncoso *et al.* (1999), Mneney e Mantell (2001) e Thimmappaiah e Puthra (2002).

O tempo de exposição ao escuro de 7 dias mostrou atuar de maneira eficiente no processo inicial de cicatrização da região enxertada, onde, provavelmente, reduziu a oxidação e a perda de vigor dos enxertos, estimulando o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Concordando com esses resultados, Mukhopadhyay *et al.* (1997) obtiveram sucesso na sobrevivência de enxertos de *Citrus reticulata* Blanco, quando mantiveram essas plantas por um curto período de tempo no escuro (4 dias), após a realização da enxertia, sugerindo possíveis efeitos negativos da exposição imediata à luz, que causaria oxidação nos enxertos.

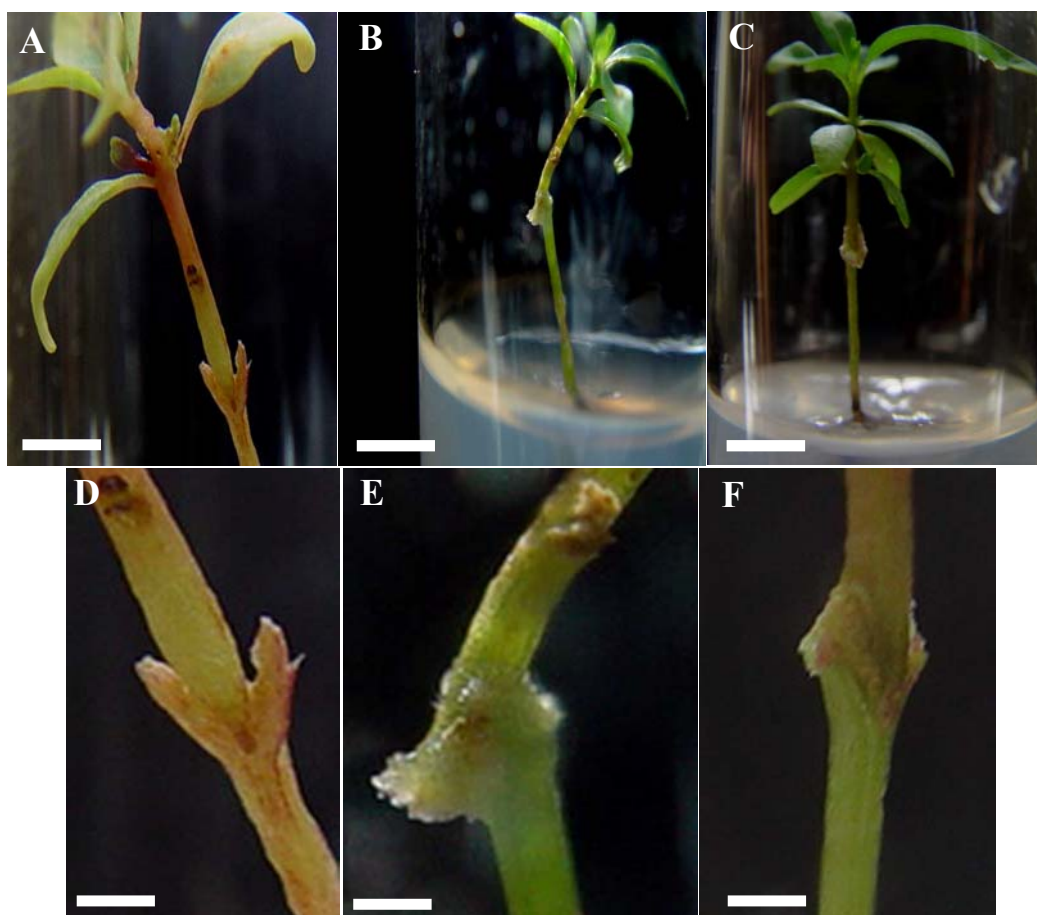
Os resultados obtidos com relação à oxidação dos enxertos estão de acordo com Paz e Pasqual (1998) e Mneney e Mantell (2001), os quais relatam que a oxidação das superfícies cortadas restringe o percentual de pegamento dos enxertos e com isso, as chances de sucesso no estabelecimento das plantas enxertadas, em muitas espécies. Segundo Mneney e Mantell (2001), a oxidação dos tecidos deve-se à exsudação de componentes fenólicos, que pela ação de enzimas peroxidases, transformam-se em substâncias tóxicas à planta, impedindo que ocorra a conexão entre enxerto e porta-enxerto.

O baixo rendimento observado no pegamento em alguns tratamentos de tempo de permanência das plantas no escuro, devido à mortalidade das plantas,

pode ser evitado de acordo com a habilidade e a rapidez durante a execução das enxertias. Esses fatores são considerados determinantes para a obtenção de resultados positivos no pegamento e sobrevivência dos enxertos, minimizando a desidratação e oxidação dos tecidos, não demandando o uso de substâncias antioxidantes. Navarro (1988) comenta que o rápido manuseio dos explantes durante a enxertia *in vitro* evitou problemas associados com a oxidação de compostos fenólicos de maneira mais efetiva, se comparados com a utilização de antioxidantes.

A metodologia de enxertia *in vitro* adotada mostrou-se eficiente, haja visto que, para os dois clones, foi observada ocorrência dos maiores percentuais no nível de pegamento considerado morfológicamente excelente (3) e menores índices nos níveis de conexão frágil (1) e regular (2) (Quadro 1 e Figura 2c). Estas observações são relevantes uma vez que o nível de pegamento 3 foi considerado o padrão ideal em termos de respostas à injúria sofrida pelas células e tecidos do enxerto e porta-enxerto no momento da enxertia.

Este nível foi caracterizado conforme a qualidade da conexão formada entre as partes enxertadas, percebendo-se visualmente, a perfeita união histológica do enxerto e porta-enxerto, apresentando baixa ou média intensidade de calejamento nesta região. No que se refere aos níveis 1 (Figura 2a) e 2 (Figura 2b), estes foram por sua vez, considerados sob o aspecto morfológico, indesejáveis em decorrência do desalinhamento e conseqüente redução da superfície de contato entre a região cambial dos tecidos do enxerto e porta-enxerto após a enxertia e em função das respostas extremas com relação à intensidade de calejamento. Observou-se ou a inexistência de calo na região de junção, conforme a Figura 2d (indicando que não houve resposta morfogênica quanto à cicatrização dos tecidos na região do enxerto) ou uma alta intensidade de calejamento, na qual a proliferação excessiva de calo refletiu a fragilidade da conexão vascular observada nestas plantas.



**Figura 2** - Níveis de pegamento das plantas de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* enxertadas *in vitro*. **(A)** nível de pegamento 1, caracterizado pela ausência de conexão (Barra =4 mm); **(B)** nível de pegamento 2, caracterizado pelo desalinhamento lateral de uma das partes do enxerto (Barra =7,5 mm); **(C)** nível de pegamento 3, caracterizado pela perfeita união entre as partes enxertadas (Barra =7,5 mm); **(D)** detalhe da região de conexão do nível 1 (Barra =2 mm); **(E)** detalhe da região de conexão do nível 2 (Barra =1,5 mm); **(F)** detalhe da região de conexão do nível 3 (Barra =2 mm).

A proliferação de calo na região enxertada caracteriza o estágio inicial ocorrido durante a primeira semana após a enxertia *in vitro* (Errea *et al.*, 1994) e segundo Barnett e Weatherhead (1988) e Hartmann *et al.* (1997) este evento, apesar de ocorrer como um mecanismo de defesa da planta visando prevenir a entrada de patógenos, constitui uma resposta natural dos organismos vegetais para a cicatrização dos tecidos injuriados. Contudo, foi observado que, para a obtenção de sucesso no pegamento das plantas, é necessário que a atividade celular durante a

formação do calo resulte em baixa ou moderada proliferação de células parenquimáticas na região de união, no sentido de apenas reconstituir a região injuriada, estabelecendo assim a comunicação celular entre as partes enxertadas. A proliferação excessiva de calo, em alguns casos, indicou a formação de uma união frágil e não necessariamente que tenha ocorrido uma perfeita reconexão vascular entre os tecidos do enxerto e porta-enxerto, seja pela qualidade dos enxertos obtidos ou até mesmo pelas diferenças anatômicas e fisiológicas entre as partes enxertadas.

Em razão da decapitação das plântulas utilizadas como porta-enxerto na região do hipocótilo, imediatamente abaixo das folhas cotiledonares, não foi registrada a presença de brotações axilares no porta-enxerto, fato que pode ter contribuído para o melhor crescimento e desenvolvimento dos enxertos. Esses resultados corroboram aqueles encontrados por Mneney e Mantell (2001) e Thimmappaiah e Puthra (2002), os quais obtiveram melhores respostas no crescimento dos enxertos de *Anacardium occidentale* L., quando utilizaram os mesmos explantes como porta-enxertos, sugerindo que a ausência de brotações axilares possivelmente tenha resultado na redução da competição com o enxerto, aumentando a eficiência no estabelecimento da conexão e crescimento das plantas.

A utilização dos porta-enxertos apresentando o sistema radicular completamente formado, além de eliminar a etapa posterior de enraizamento das plantas enxertadas, pode ter proporcionado efeito favorável no pegamento e crescimento dos enxertos, os quais, já com 50 dias de idade, mostravam-se aptos à transferência para a casa de vegetação. Provavelmente, as citocininas sintetizadas nos ápices das raízes e transportadas de modo ascendente para a parte aérea podem ter influenciado os eventos iniciais que precedem a formação da união entre os tecidos do enxerto e porta-enxerto. Segundo Taiz e Zeiger (1991), as citocininas também participam do processo de diferenciação das células traqueais em cultura de células do mesófilo de *Zinnia elegans*, provavelmente pelo aumento da sensibilidade das células à auxina produzida nas partes aéreas. Esses autores comentam que ambos os hormônios, possivelmente, regulam a ativação do câmbio e a diferenciação vascular.

Considerando os resultados de pegamento obtido nas plantas enxertadas para os dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, pode-se dizer que a enxertia *in vitro* apresenta potencial e viabilidade de aplicação na propagação clonal de *Eucalyptus*, buscando atender à demanda de material vegetal para programas de pesquisa mais refinados nesse contexto. Entretanto, vale ressaltar que, tratando-se de uma técnica morosa, exige alto grau de destreza e habilidade durante o manuseio dos explantes, necessitando portanto de mão-de-obra qualificada para que se obtenha êxito no pegamento e sobrevivência das plantas enxertadas.

Quanto às diferenças de resposta observadas entre os dois clones estudados em relação às duas espécies de porta-enxertos, estas se devem ao efeito dos tratamentos, aliado à interação genotípica, fisiológica e anatômica das diferentes espécies de enxerto e porta-enxerto associadas. Essas observações são complementadas por Monteuis (1994), ressaltando que a variabilidade intraclonal observada nesta técnica pode ser atribuída a fatores como a qualidade do grau de conexão dos enxertos, a diversidade genética das plântulas utilizadas como porta-enxertos, além do status fisiológico dos ápices caulinares excisados na época da realização da enxertia.

### **3.2. Crescimento em altura das plantas enxertadas *in vitro***

Para o clone 1, observaram-se diferenças significativas entre os porta-enxertos apenas nos tempos de 0 e 21 dias de permanência no escuro, ao passo que o clone 2 apresentou diferenças significativas em todos os tempos no escuro (Quadro 2).

Em relação ao tempo de permanência das plantas no escuro, para o clone 1, observou-se que, para os dois porta-enxertos utilizados, a não exposição das plantas ao escuro mostrou ser o melhor tratamento, apresentando os maiores valores médios de altura total. O contrário pode-se dizer do maior período em regime de escuridão (21 dias), que resultou em menor crescimento das plantas, indicando que o longo período na ausência de luz afetou a dinâmica de crescimento e desenvolvimento das



mesmas. Quanto ao efeito dos porta-enxertos, observou-se melhor resposta no porta-enxerto *Eucalyptus urophylla*, exceto nos tempos de 7 e 14 dias no escuro, os quais não apresentaram diferenças estatísticas.

**Quadro 2** – Médias da altura total (cm) das plantas enxertadas *in vitro* referentes às combinações dos enxertos Clone 1 e Clone 2 com os porta-enxertos *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, avaliadas após 50 dias de realização da enxertia *in vitro*.

Enxerto	Porta-enxerto	Altura total das plantas (cm) - 50 dias			
		Dias no escuro			
		0	7	14	21
Clone1	<i>E. urophylla</i>	3,4 Aa	3,2 ABa	3,2 ABa	3,0 Ba
	<i>E. grandis</i>	3,1 Ab	3,1 Aa	3,1 Aa	2,7 Bb
Clone 2	<i>E. urophylla</i>	3,7 Aa	3,1 Ca	3,5 ABa	3,4 Ba
	<i>E. grandis</i>	2,9 Ab	2,8 ABb	2,5 Bb	2,5 Bb

As médias seguidas por uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de um mesmo clone, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No que se refere ao clone 2, também foram observadas respostas diferenciadas, com melhores resultados quanto ao crescimento, quando as plantas não permaneceram no escuro após a enxertia. Em relação aos porta-enxertos, de maneira semelhante ao observado para o clone 1, os melhores resultados foram obtidos quando as plantas foram enxertadas em *E. urophylla*.

Esses resultados indicam que a exposição das plantas ao escuro durante a fase de estabelecimento dos enxertos *in vitro*, principalmente o maior período (21 dias), em termos gerais, exerceu efeito negativo sobre o vigor das plantas, afetando, conseqüentemente, o crescimento em altura das mesmas.

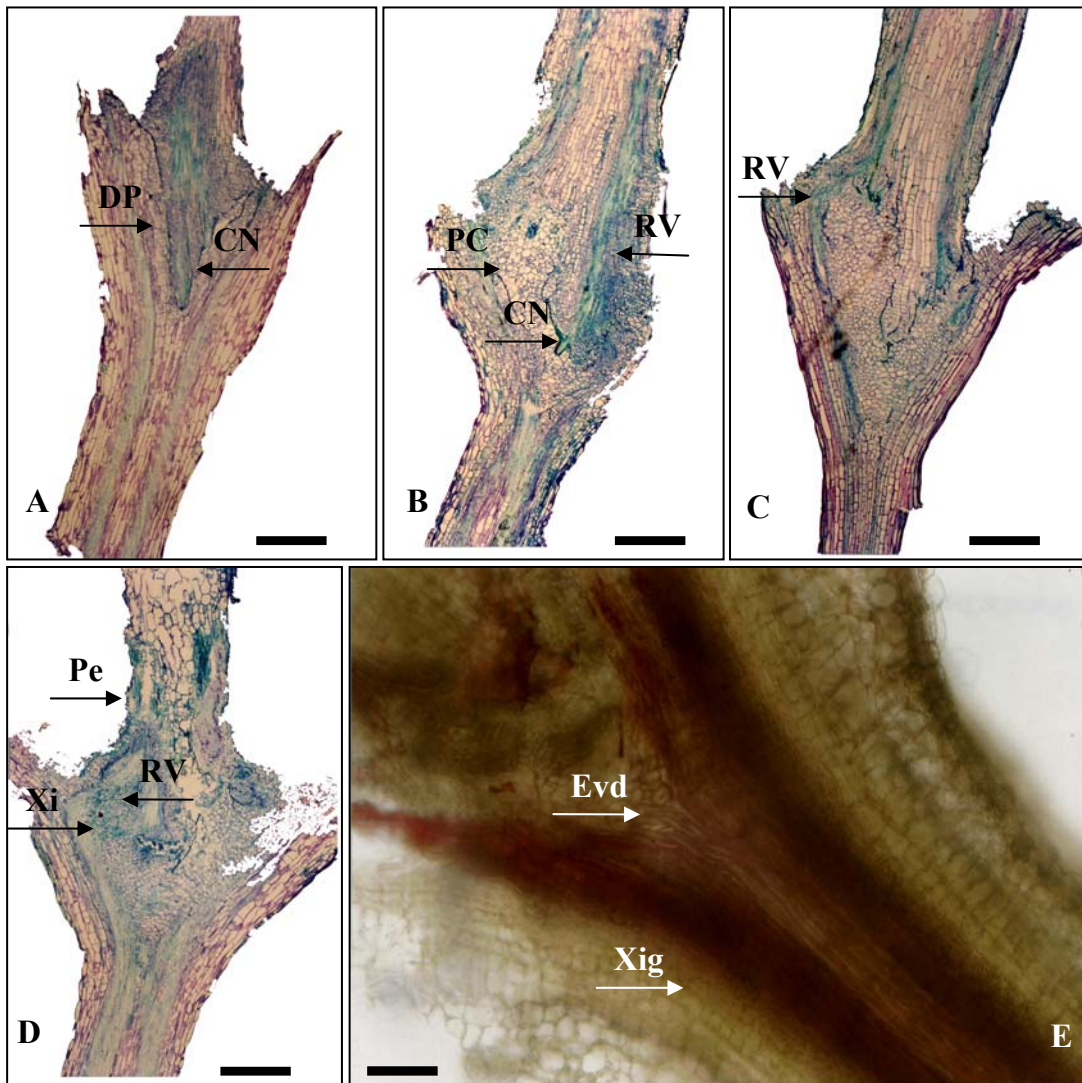
Em relação aos porta-enxertos utilizados, os resultados obtidos estão de acordo com Hartmann *et al.* (1997), que comentam sobre os possíveis efeitos da espécie utilizada de porta-enxerto sobre o crescimento dos enxertos. Além disso, as variações de resposta observadas entres os clones e os porta-enxertos podem ser

atribuídas às diferentes interações genéticas e fisiológicas estabelecidas entre as partes enxertadas.

### **3.3. Análise histológica**

As análises histológicas revelaram que aos 7 dias após a enxertia *in vitro*, ocorreu a formação de uma camada de células necrosadas, delimitando a região na qual foi realizada o corte dos tecidos do enxerto e porta-enxerto durante a enxertia. Posteriormente, observou-se a adesão entre as partes enxertadas, com intensa atividade celular ocorrendo na região de conexão. Este evento inicial está representado pela divisão mais pronunciada de células parenquimáticas no sentido periclinal, preenchendo assim a região injuriada (Figura 3a). De acordo com Moore e Walker (1981a), a adesão é explicada pela contínua deposição de materiais que darão origem à parede celular das células do calo formado na região de interface entre enxerto e porta-enxerto. Além disso, este evento é responsável pelo estabelecimento da comunicação celular entre os tecidos que compreendem o calo e pela formação da continuidade vascular entre as partes enxertadas.

A proliferação de calo na região de interface entre enxerto e porta-enxerto caracterizou o terceiro evento ocorrido após a realização da enxertia (Figura 3b). Segundo Moore (1984), a formação do calo é um processo fundamental na conexão das plantas, uma vez que atua na união física do enxerto e porta-enxerto. Barnett e Weatherhead (1988) e Hartmann *et al.* (1997) acrescentam que este evento ocorre como uma resposta natural de cicatrização à injúria sofrida pelos tecidos. Moore e Walker (1981a) comentam que a proliferação do calo durante a enxertia, provavelmente permite a formação de células ainda não diferenciadas ao longo da região de interface, as quais darão origem às células do novo tecido vascular. Estes autores citam que esta resposta morfogênica atua na fragmentação da camada de células necrosadas, que é absorvida pelos tecidos em regeneração durante o processo cicatricial, permitindo com isso, um contato direto entre as células remanescentes.



**Figura 3** – Análise histológica da enxertia *in vitro* em clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. Cortes longitudinais. **(A)** formação da camada de células necrosadas na região de união do enxerto com 7 dias de idade (Barra =180  $\mu$ m); **(B)** proliferação de calo na região de injúria e reconexão vascular em enxerto com 14 dias (Barra =180  $\mu$ m); **(C)** planta enxertada com 21 dias (Barra =80  $\mu$ m); **(D)** enxerto com 50 dias (Barra =75  $\mu$ m); **(E)** xilogênese em enxerto com 43 dias de idade (Barra =120  $\mu$ m). CN - camada de células necrosadas delimitando a região injuriada; DP - divisões periclinais de células do parênquima; PC – proliferação de calo na região de conexão; RV – reconexão vascular; Pe – periderme; Xi – xilema; Xig – xilogênese na região de união entre as partes enxertadas; Evd - elementos de vaso em diferenciação.

Aos 14 dias, observou-se uma absorção quase completa da camada de células necrosadas como uma resposta de cicatrização da região do calo, com células parenquimáticas interligando enxerto e porta-enxerto. Percebe-se ainda o início do processo de diferenciação xilemática já apresentando indícios de reconexão vascular entre as partes enxertadas (Figura 3b). Moore e Walker (1981a) também observaram, em enxertos de *Sedum telephoides*, que o processo de reconexão vascular ocorreu 14 dias após a realização da enxertia.

A diferenciação de células parenquimáticas em elementos de vaso, tanto no enxerto como no porta-enxerto, ocorreu na região próxima aos tecidos vasculares interrompidos pela incisão.

Este evento seguiu o mesmo padrão de desenvolvimento e diferenciação vascular ocorrido na união do enxerto e porta-enxerto em espécies de cactus (Estrada-Luna *et al.*, 2002). Abousalim e Mantell (1992), em estudo com a enxertia *in vitro* em *Pistacia vera*, citam que a continuidade vascular foi estabelecida ao longo da região de conexão após 21 dias, ao passo que Estrada-Luna *et al.* (2002) observaram em enxertos de cactus, este evento ocorrendo aos 28 dias após a realização da enxertia.

Aos 21 dias, é possível observar um estágio mais avançado de conexão, onde a proliferação do calo na região de interface é bastante evidente, bem como a existência de células parenquimáticas ainda em divisão preenchendo uma das regiões laterais do enxerto de maneira a concluir a cicatrização dos tecidos (Figura 3c). O mesmo evento verificado aos 14 dias quanto à diferenciação de células parenquimáticas em elementos de vaso foi observado aos 21 dias, porém mostrando-se de forma mais proeminente e com um maior grau de organização dos tecidos do enxerto.

Aos 43 dias, a coloração com floroglucina evidenciou a diferenciação de elementos de vaso e a conseqüente reconstituição vascular, conforme pode ser observado na Figura 3e. Observou-se claramente, a continuidade vascular ligando os tecidos do enxerto aos do porta-enxerto. Ermel *et al.* (1997), em estudo envolvendo a enxertia *in vitro* em espécies de pessegueiro e marmeleiro,

evidenciaram a diferenciação de elementos de vaso a partir de células do calo, indicando a presença de lignina já aos 6 dias após a enxertia.

O restabelecimento da continuidade vascular na zona de interface é considerada por Yeomann e Brown (1976) e Moore (1984), um evento crítico que determina a formação de combinações compatíveis entre enxerto e porta-enxerto durante a reconexão. Contrariando essas afirmações, Herrero (1951) observou plantas enxertadas de pessegueiro e ameixeira sobrevivendo normalmente por alguns anos, mesmo na ausência de continuidade vascular, sugerindo que este evento não está necessariamente relacionado ao sucesso do pegamento dos enxertos e tampouco à compatibilidade e incompatibilidade entre os tecidos envolvidos. Moore e Walker (1981a) e Asante e Barnett (1997) ressaltam a importância da restauração da continuidade vascular, uma vez que este evento assegura o transporte eficiente de água e nutrientes entre as partes enxertadas.

Aos 50 dias, o processo de xilogênese apresentou-se completamente estabelecido, sendo demonstrado pelos feixes vasculares unindo os tecidos do enxerto aos do porta-enxerto (Figura 3d).

A formação da união do enxerto observada na análise histológica acompanhou o mesmo padrão apresentado por Moore (1984), Asante e Barnett (1997), Ermel *et al.* (1997), Hartmann *et al.* (1997) e Troncoso *et al.* (1999). Segundo esses autores, a união compatível entre enxerto e porta-enxerto é compreendida por três eventos básicos: adesão entre os tecidos do enxerto e porta-enxerto, proliferação e entrelaçamento de células do calo na interface de união e diferenciação vascular ao longo da interface.

Em *Eucalyptus*, observou-se que a reconstituição vascular das plantas enxertadas deu-se aos 14 dias após a enxertia, indicando uma união perfeita e sem sinais de rejeição, quando comparada aos estudos desenvolvidos em outras espécies lenhosas. Vale salientar que, diante da escassez de informações pertinentes à caracterização anatômica da conexão vascular do enxerto em espécies desse gênero, esses resultados, embora incipientes, confirmam a eficiência de aplicação da enxertia *in vitro* na propagação vegetativa de clones de *Eucalyptus*.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a metodologia de enxertia *in vitro* adotada foi estabelecida de maneira eficiente, nos dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*.

Os melhores resultados quanto ao pegamento e crescimento em altura dos enxertos foram obtidos quando as plantas permaneceram entre 7 a 14 dias no escuro, tendo o processo de cicatrização e reconexão vascular das plantas enxertadas ocorrido aos 14 dias após a realização da enxertia *in vitro*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSALIM, A.; MANTELL, S. H. Micrografting of pistachio (*Pistacea vera* L. cv. Mateur). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 29, p. 231-234, 1992.

ASANTE, A. K.; BARNETT, J. R. Graft union formation in mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Horticultural Science**, v. 72, n. 5, p. 781-790, 1997.

BARNETT, J. R.; WEATHERHEAD, I. Graft formation in sitka spruce: a scanning electron microscope study. **Annals of Botany**, v. 61, p. 581-587, 1988.

ERMEL, F. F.; POESSEL, J. L.; FAUROBERT, M.; CATESSON, A. M. Early scion/stock junction in compatible and incompatible pear/pear and pear/quince grafts: a histo-cytological study. **Annals of Botany**, v. 79, p. 505-515, 1997.

ERREA, P.; FELIPE, A.; HERRERO, M. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 272, p. 393-401, 1994.

ERREA, P. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. **Scientia Horticulturae**, v. 74, p. 195-205, 1998.

ERREA, P.; GARAY, L.; MARÍN, J. A. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 135-141, 2001.

ESTRADA-LUNA, A. A.; LÓPEZ-PERALTA, C.; SORIANO-CÁRDENAS, E. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). **Scientia Horticulturae**, v. 92, p. 317-327, 2002.

- EWALD, D.; KRETZSCHMAR, U. The influence of micrografting *in vitro* on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 249-252, 1996.
- FEUCHT, W.; SCHMID, P. P. S. Phenolic compounds in the phloem of *Prunus* trees, section *Eucerasus*. **Scientia Horticulturae**, v. 10, p. 387-394, 1979.
- GEBHARDT, K.; GOLDBACH, H. Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. **Physiologia Plantarum**, v. 72, p. 153-159, 1988.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.
- HERRERO, J. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. **Journal of Horticultural Science**, v. 26, n. 3, p. 186-237, 1951.
- HUANG, L. C.; LIUS, S.; HUANG, B. L.; MURASHIGE, T.; MAHDI, E. F. M.; VAN GUNDY, R. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. *Plant Physiology*, v. 98, p. 166-173, 1992.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry**. São Francisco: H. Freeman and c.o, 1962. 408p.
- KRETZSCHMAR, U.; EWALD, D. Vegetative propagation of 140-year-old *Larix decidua* trees by different *in vitro* techniques. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 627-630, 1994.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.
- MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. *In vitro* micrografting of cashew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 49-58, 2001.
- MONTEUUIS, O. Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*. **Silvae Genetica**, v.43, n. 2-3, p. 91-95, 1994.
- MONTEUUIS, O. *In vivo* grafting and *in vitro* micrografting of *Acacia mangium*: impact of ortet age. **Silvae Genetica**, v. 44, n. 4, p. 190-193, 1995.
- MOORE, R. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. **American Journal of Botany**, v. 71, n. 5, p. 752-758, 1984.

MOORE, R.; WALKER, B. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograft in *Sedum telephoides* (crassulaceae). **American Journal of Botany**, v. 68, n. 6, p. 820-830, 1981a.

MUKHOPADHYAY, S.; JAISHREE RAI, B. C.; SHARMA, A. G.; SENGUPTA, R. K.; NATH, P. S. Micropropagation of darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting. **Journal of Horticultural Science**, v. 72, n. 3, p. 493-499, 1997.

MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. **HortScience**, v. 7, n. 2, p. 118-119, 1972.

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

NAVARRO, L. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to wood species. **Acta Horticulturae**, v. 227, p. 43-55, 1988.

O'BRIEN, T.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Temarcarphi Pty Ltda, 1981. 45 p.

OLIVEIRA, M. L. **Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus* spp.** Viçosa, MG: UFV, 2003, 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

PAIVA, L. V.; CARVALHO, S. A.; SOUZA, M. Limpeza clonal da laranjeira “seleta folha murcha” através da microenxertia *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 1341-1344, 1993.

PAZ, O. P.; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI / EMBRAPA – CNPH, 1998. v. 1, p. 147-160.

PERRIN, Y.; LARDET, L.; ENJALRIC, F.; CARRON, M. P. Rejuvenation of mature clones of *Hevea brasiliensis* by *in vitro* micrografting. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 74, n. 3, p. 623-630, 1994.

PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. **HortScience**, v. 22, n. 6, p. 1321-1324, 1987.



RAMANAYAKE, S. M. S. D.; KOOVOR, A. *In vitro* micrografting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 265-268, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 1ed. Califórnia: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991. 565 p.

THIMMAPPAIAH, S. S. R. A.; PUTHRA, G.T. *In vitro* grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticultrae**, v.92, p. 177-182, 2002.

TRONCOSO, A.; LINAN, J.; CANTOS, M.; ACEBEDO, M. M. Feasibility and anatomical development of an *in vitro* olive cleft-graft. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 584-587, 1999.

YEOMAN, M. M.; BROWN, R. Implications of the formation of the graft union for organisation in the intact plant. **Annals of Botany**, v. 40, p. 1265-1276, 1976.

WARDROP, A. B. Occurrence and formation in plants. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Eds.). **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley-Interscience, 1971, p. 19-42.

WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v.30, p.33-36, 1943.

## **ACLIMATIZAÇÃO *EX VITRO* DE PLANTAS PROPAGADAS PELA ENXERTIA *IN VITRO* DE CLONES DE *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis***

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência e o crescimento em altura durante a etapa de aclimatização *ex vitro* de mudas de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* obtidas pela técnica de enxertia *in vitro*. Para a obtenção das plantas enxertadas, foram utilizados porta-enxertos oriundos de plântulas de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, germinadas *in vitro* e como enxertos, ápices caulinares de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* micropropagados. Após 50 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram transferidas para a condição *ex vitro*, avaliando-se a sobrevivência e o crescimento em altura das mudas. Houve elevados índices de sobrevivência dos enxertos (87%) aos 70 dias na condição *ex vitro*, assim como bom vigor no crescimento em altura. Notou-se comportamento semelhante entre os clones, em relação aos porta-enxertos utilizados, indicando que o processo de aclimatização adotado mostrou-se eficiente.

**Palavras-chave:** propagação clonal, enxertia *in vitro*, cultura de tecidos.

## ***EX VITRO* ACCLIMATION OF PLANTS PROPAGATED BY *THE IN VITRO* GRAFTING OF *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis* CLONES**

ABSTRACT – The objective of this work was to evaluate the survival and height growth during the *ex vitro* acclimation stage of the saplings of two *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* clones obtained by the *in vitro* grafting technique. For the obtention of grafted plants, stocks from seedlings of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* germinated *in vitro*, and, as scions, stem tops of two *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis* clones micropropagated were used. After 50 days of *in vitro* cultivation, the plants were transferred to the *ex vitro* condition and plant survival and height growth were evaluated. There were high survival rates of the graftings (87%) at 70 days in the *ex vitro* condition, also a good vigor in the growth height. It was observed a similar behavior between the clones, in relation to the stocks used, indicating that the acclimation process adopted showed to be efficient.

**Keywords:** clonal propagation, *in vitro* grafting, tissue culture.

## 1. INTRODUÇÃO

A enxertia *in vitro* consiste numa técnica de propagação vegetativa com aplicação em diversas espécies lenhosas, especialmente em frutíferas e florestais, atendendo a diferentes propósitos. Esta técnica baseia-se em enxertar, em condições assépticas, um ápice caulinar constituído de dois a três pares de folhas em porta-enxertos estabelecidos *in vitro* (Jonard, 1986; Moore, 1991; George, 1993).

Dentre as suas aplicações, merecem destaque a possibilidade de limpeza clonal, obtendo-se plantas isentas de vírus (Murashige *et al.*, 1972; Paiva *et al.*, 1993; Mukhopadhyay *et al.*, 1997); os estudos relacionados à incompatibilidade entre as partes enxertadas (Moore e Walker, 1981a; Moore e Walker, 1981b; Moore, 1984; Errea *et al.*, 1994; Errea *et al.*, 2001), bem como o rejuvenescimento em espécies lenhosas de difícil enraizamento, quando realizada de forma seriada (Pliegro-Alfaro e Murashige, 1987; Perrin *et al.*, 1994; Ewald e Kretzschmar, 1996).

Em *Eucalyptus*, a enxertia *in vitro* compreende quatro etapas, constituídas pela obtenção e preparo dos porta-enxertos, obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, obtenção e preparo dos enxertos, constituídos de ápices caulinares de clones micropropagados, enxertia por garfagem, na qual é realizada a abertura da fenda no porta-enxerto e pela aclimatização das plantas na condição *ex vitro*.

A fase de transferência das plantas estabelecidas *in vitro*, visando a aclimatização e rustificação em condições *ex vitro* constitui importante etapa na formação de mudas de qualidade, uma vez que esse material passa de uma condição heterotrófica para autotrófica sofrendo, naturalmente, estresses fisiológicos. Em muitas situações, esse processo, quando realizado inadequadamente, pode resultar em perdas consideráveis do material propagado (George, 1993), uma vez que a transferência para casa de vegetação implica na rápida desidratação das plantas, como resultado da mudança das condições ambientais (Donnelly e Tisdall, 1993). Segundo George (1993), as plantas produzidas num ambiente *in vitro* recebem as fontes de carboidratos, tal como a sacarose, prontamente disponível no meio de

cultura, além de serem cultivadas sob baixa irradiância, não dependendo totalmente de sua atividade fotossintética durante este período.

O ambiente *in vitro* é caracterizado por uma atmosfera saturada, baixa irradiância (12 a 70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), temperatura relativamente alta e constante (20 a 28 °C), reduzidas trocas gasosas entre os recipientes e a atmosfera externa, além das elevadas concentrações de carboidratos e reguladores de crescimento no meio de cultura (Donnelly e Tisdall, 1993; Kadlecek *et al.*, 2001). Quando são transferidas desse ambiente para uma condição externa, as plantas devem passar por um período de aclimatização, em que a redução da umidade relativa e a exposição à alta irradiância são efetuadas de maneira gradativa, no sentido de aumentar as chances de sobrevivência das plantas (George, 1993; Campostrini e Otoni, 1996; Hartmann *et al.*, 1997; Grattapaglia e Machado, 1998).

Um outro aspecto que deve ser observado, refere-se ao fato de que as plantas cultivadas *in vitro*, dadas as condições de umidade e luminosidade a que são submetidas nesta fase, sofrem uma série de alterações fisiológicas e morfológicas durante seu desenvolvimento (Donnelly e Tisdall, 1993; Pospisilová *et al.*, 1999). Entre essas alterações, destaca-se a perda da camada de cera epicuticular, que minimiza a taxa de transpiração, tendo como principal consequência, a rápida desidratação dos tecidos, quando as plantas são transferidas para a casa de vegetação (George, 1993; Grattapaglia e Machado, 1998).

Navarro (1988) comenta que, para obtenção de sucesso nos resultados, é imprescindível a disponibilidade de uma estrutura de casa de vegetação em perfeita condição de funcionamento, além do manejo intensivo que deve ser dispensado às plantas enxertadas *in vitro*, dada a fragilidade desse material vegetal ainda pouco lignificado.

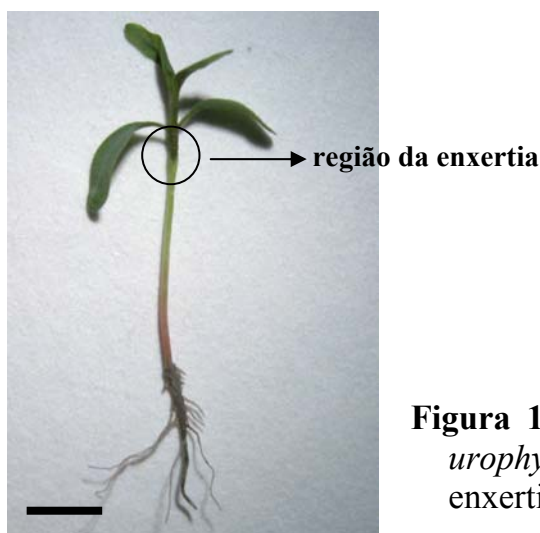
Para *Eucalyptus*, são escassas literaturas sobre a aplicação da enxertia *in vitro*, principalmente referindo-se à fase de aclimatização e rustificação de plantas enxertadas *in vitro*. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência e o crescimento em altura de mudas de dois clones de *Eucalyptus*

*urophylla* x *E. grandis*, obtidas pela enxertia *in vitro*, durante a fase de aclimatização e rustificação *ex vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas enxertadas *in vitro* de dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em porta-enxertos obtidos de sementes de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* germinadas em condições assépticas.

Para a obtenção das plantas enxertadas, inicialmente foram obtidos os porta-enxertos a partir de sementes germinadas *in vitro*, com o sistema radicular completo, realizando-se a decapitação da parte aérea imediatamente abaixo das folhas cotiledonares. Os enxertos foram constituídos por ápices caulinares com aproximadamente 1cm de comprimento, extraídos de clones mantidos pela micropropagação via proliferação de gemas axilares. Em seguida, foi realizada a enxertia *in vitro* por garfagem, caracterizada pela abertura da fenda no topo do porta-enxerto na qual foi inserido o enxerto (Figura 1).



**Figura 1** – Planta enxertada *in vitro* de clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* imediatamente após a realização da enxertia (Barra = 12 mm).

As plantas enxertadas foram acondicionadas em sala de crescimento à temperatura de  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ , onde permaneceram até os 50 dias após a enxertia. Os enxertos foram submetidos a diferentes tratamentos de permanência em regime de

escuridão após a realização da enxertia. O tratamento T1 foi o controle, correspondendo a 0 dias no escuro; o T2, a 7 dias no escuro; o T3, a 14 dias no escuro e o T4 correspondendo a 21 dias no escuro. Decorrido o tempo de permanência no escuro referente a cada tratamento, as plantas foram transferidas para condição de fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (fornecida por tubos fluorescentes, luz do dia, Osram<sup>®</sup>, de 20 Watts), até completar a etapa *in vitro* (50 dias).

A etapa de aclimatização das mudas enxertadas foi realizada em condições *ex vitro*. Aos 50 dias de idade, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação, localizada no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa. As condições de umidade na casa de vegetação, ficaram em torno de 80% e a temperatura a 27 °C. O plantio foi realizado de forma tal que a região de união do enxerto apresentasse uma distância de aproximadamente 1 cm acima do nível do substrato.

As plantas foram transplantadas para tubetes plásticos de 55 cm<sup>3</sup>, contendo como substrato, vermiculita de granulometria média e adubação composta por 8 Kg m<sup>-3</sup> de N:P:K (8:28:16). Após 25 dias em casa de vegetação, as plantas foram transferidas para a casa de sombra (sombrite 50%), onde permaneceram por 7 dias, sendo nesta etapa, tutoradas com hastes de madeira. Em seguida, foram transferidas para a condição de pleno sol, permanecendo até os 70 dias de idade na condição *ex vitro*.

A nutrição mineral utilizada foi composta pela aplicação semanal de 0,05 g por planta de macro e micronutrientes (sulfato de amônio 20 g L<sup>-1</sup>, cloreto de potássio 3,33 g L<sup>-1</sup>, sulfato de zinco 0,22 g L<sup>-1</sup>, sulfato de cobre 0,22 g L<sup>-1</sup>, sulfato de manganês 0,22 g L<sup>-1</sup> e ácido bórico 0,39 g L<sup>-1</sup>), durante toda a fase de aclimatização e rustificação *ex vitro*.

As avaliações foram realizadas quanto à sobrevivência e crescimento em altura dos enxertos na saída da casa de vegetação (25 dias), na saída da casa de sombra (32 dias) e aos 50 e 70 dias na condição de pleno sol.

Os tratamentos envolvidos nesta avaliação foram aqueles referentes à eficiência da propagação pela enxertia *in vitro* dos dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* em porta-enxertos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. Avaliaram-se também os efeitos na sobrevivência e crescimento em altura na condição *ex vitro*, em relação aos diferentes tempos de permanência dos enxertos no escuro (0, 7, 14 e 21 dias) na fase inicial da condição *in vitro*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se respostas satisfatórias dos dois clones à fase de aclimatização, resultando em até 87% de sobrevivência das plantas ao final do período de avaliação *ex vitro* (Quadro 1). Para os dois porta-enxertos avaliados, os menores percentuais de sobrevivência (20 a 53%) foram observados no clone 2. Esses resultados são atribuídos à mortalidade após a saída da casa de vegetação, causada por estresses fisiológicos sofridos pelas plantas na casa de sombra e pleno sol, onde a mudança nas condições climáticas são mais drásticas. Vale salientar que as plantas que não sobreviveram a essa fase foram aquelas com níveis de pegamento ruim (ausência de pegamento) e regular, provavelmente em função da qualidade dos enxertos estabelecidos *in vitro*. Decorridos 70 dias em condições de pleno sol, os maiores percentuais de sobrevivência foram observados nos clones enxertados sobre *Eucalyptus grandis*.

Quanto aos tratamentos de tempos de permanência no escuro na condição *in vitro*, pode-se dizer que os melhores resultados foram observados quando as plantas permaneceram até 14 dias no escuro, com exceção do clone 1 e clone 2, enxertados em *E. grandis*, cujo melhor tempo foi de 7 dias. Na transferência para o viveiro, observou-se alta mortalidade, principalmente para o clone 2 enxertado em *E. urophylla*, mantido por 7 e 21 dias no escuro, e quando enxertado em *E. grandis*, mantido no escuro por 14 e 21 dias.

**Quadro 1** – Sobrevivência *ex vitro* das plantas enxertadas *in vitro* referente às combinações dos enxertos de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* com porta-enxertos de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, em função dos tratamentos de tempo de permanência no escuro (dias), avaliados aos 25, 32, 50 e 70 dias de idade.

Enxerto	Porta-enxerto	Dias no escuro na condição <i>in vitro</i>	Sobrevivência dos enxertos <i>ex vitro</i> (%)			
			Período (dias)			
			25	32	50	70
Clone 1	<i>E. urophylla</i>	0	80	80	80	73
		7	67	67	67	67
		14	67	67	67	67
		21	60	60	53	53
	<i>E. grandis</i>	0	60	60	60	60
		7	87	87	87	87
		14	87	87	80	80
		21	73	73	73	73
Clone 2	<i>E. urophylla</i>	0	60	53	47	47
		7	47	47	33	27
		14	60	60	53	53
		21	20	20	20	20
	<i>E. grandis</i>	0	80	80	80	80
		7	93	87	87	87
		14	27	27	20	20
		21	33	33	33	33

A mortalidade observada nos dois clones após a transferência para casa de vegetação, pode ser explicada pelas inúmeras alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas que as plantas cultivadas em ambiente *in vitro* sofrem, quando transferidas para as condições *ex vitro*. Em condições *in vitro*, as plantas apresentam em geral, tamanho e área foliar reduzidos, comparativamente àquelas desenvolvidas em casa de vegetação. Apresentam ainda, reduzida camada de cera epicuticular na epiderme das folhas e maior volume de água nas folhas acompanhado de redução no acúmulo de matéria seca, refletindo em baixa resistência mecânica dos tecidos de sustentação, que por sua vez são constituídos de células de paredes pouco espessadas (Donnelly e Tisdall, 1993; Otoni e Campostrini, 1996; Pospisilová *et al.*, 1999). Com relação à estrutura foliar, as principais alterações morfológicas na fase de aclimatização referem-se ao espessamento da lâmina foliar, número de cloroplastos e diferenciação do mesofilo. O aparelho fotossintético ineficiente, e o retardo no desenvolvimento da cutícula, cera epicuticular e de estômatos funcionais em plantas cultivadas *in vitro*, resultam em elevadas taxas de transpiração cuticular



(Pospisilová *et al.*, 1999). Tal fato leva ao dessecamento e murchamento da folha, sendo considerada a causa mais comum da baixa sobrevivência pós-transplântio. Neste aspecto, a aclimatização constitui uma etapa crucial no sentido de contornar os estresses fisiológicos impostos às plantas cultivadas *in vitro* e assegura o desenvolvimento da capacidade autotrófica, essencial para a sobrevivência das plantas em condições *ex vitro* (Carvalho *et al.*, 2002).

Segundo Pospisilová *et al.* (1999) e Kadlecek *et al.* (2001), as anormalidades na morfologia, anatomia e fisiologia de plantas cultivadas *in vitro* são reparadas após a transferência para as condições *ex vitro*. Dentre as mudanças mais importantes observadas na planta, destaca-se o desenvolvimento da cutícula e cera epicuticular e do mecanismo de regulação estomática da transpiração, conduzindo à estabilização do status hídrico da planta.

Kadlecek *et al.* (2001) interpretaram as alterações na morfologia e fisiologia em plantas de *Nicotiana tabacum* cultivadas *in vitro*, como reações ao estresse sofrido em resposta às mudanças abruptas de ambiente após a transferência para as condições *ex vitro*. Provavelmente, no transplântio para a casa de vegetação, os pêlos radiculares são danificados devido à remoção do sistema radicular do meio de cultura e transferência para o solo. Conseqüentemente, durante este procedimento, a absorção de água e nutrientes pelo sistema radicular pode ser prejudicada. Com relação à transferência para pleno sol, o principal fator de estresse para as plantas é atribuído ao aumento considerável nos níveis de irradiância.

Apesar da mortalidade observada para os dois clones após a transferência para as condições *ex vitro*, a qualidade e o vigor das mudas obtidas após a rustificação (70 dias), aliado ao elevado percentual de sobrevivência (80-87%), confirmam a eficiência da reconexão vascular e do estabelecimento dos enxertos de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* mediante a aplicação da enxertia *in vitro*. Além de muitas plantas nesse estágio de desenvolvimento já não exibirem os sinais de cicatrização da região injuriada, ou seja, do ponto exato onde foi realizada a enxertia, essas plantas mostraram-se fisiologicamente ativas, fato constatado pelo crescimento, desenvolvimento e expansão foliar dos enxertos nesta fase (Figura 2).



**Figura 2** – Planta enxertada *in vitro* de clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* aos 70 dias em condição de pleno sol, após a etapa de aclimatização *ex vitro* (Barra = 35 mm).

Esses resultados corroboram os apresentados por Navarro (1988) que obteve elevado percentual de sobrevivência (95%) em mudas de citros enxertadas *in vitro*, após o transplante para a casa de vegetação. Estrada-Luna *et al.* (2002) não encontraram dificuldades nessa fase, com 100% de sobrevivência após a transferência das plantas enxertadas de cactus para as condições *ex vitro*. Troncoso *et al.* (1999) também relatam que obtiveram resultados satisfatórios, com taxa de sobrevivência de 67% em plantas de oliveira, após a fase de aclimatização *ex vitro*. No entanto, Navarro (1988) comenta que, para a obtenção de resultados positivos, é necessário que se disponha de uma estrutura eficiente de casa de vegetação, além do manejo intensivo que deve ser dispensado às plantas enxertadas.

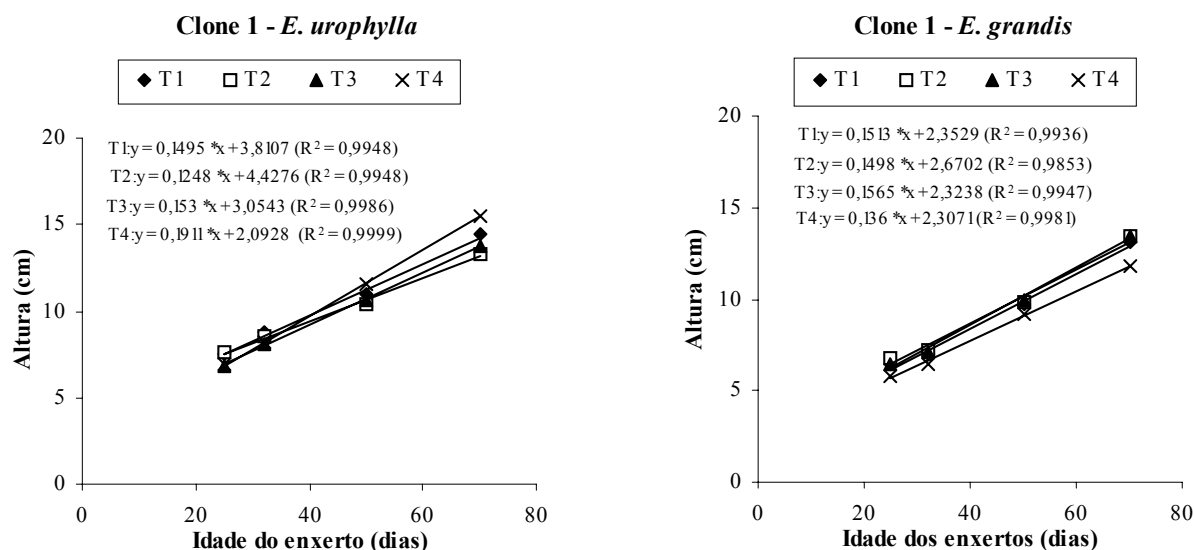
Diante dos resultados obtidos quanto ao pegamento e sobrevivência das plantas enxertadas, após a transferência para as condições *ex vitro*, e considerando o fato de se tratar de um trabalho pioneiro em *Eucalyptus*, bem como as dificuldades operacionais de execução da técnica, onde destreza e habilidade manual são considerados fatores limitantes para a obtenção de respostas positivas, a enxertia *in vitro* nas condições experimentais adotadas no presente estudo indicou viabilidade de aplicação no que se refere à obtenção de mudas clonais ao final da etapa de aclimatização e rustificação para os dois clones avaliados.

Cabe mencionar que a variação de resposta observada entre enxertos e porta-enxertos pode ser justificada pela qualidade da conexão dos enxertos (Monteuuis, 1994) e também pelas interações genótípicas, bioquímicas e fisiológicas entre as diferentes partes enxertadas (Herrero, 1951; Monteuuis, 1994 e Hartmann *et al.* 1997).

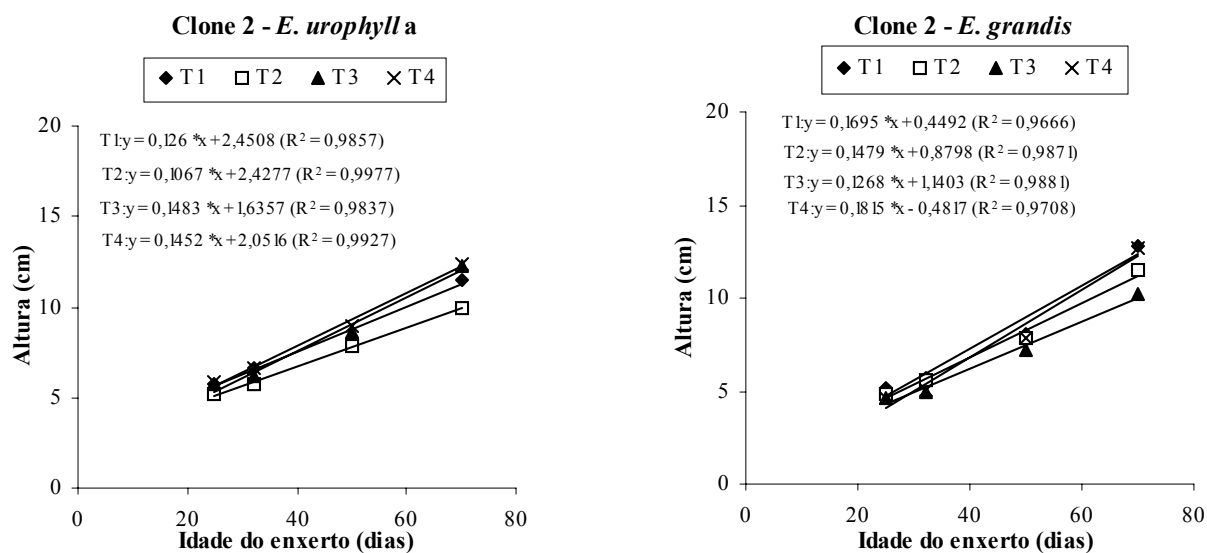
Em relação ao crescimento em altura dos enxertos, as plantas que sobreviveram à etapa de aclimatização *ex vitro*, apresentaram crescimento vigoroso com expansão e desenvolvimento foliar no período avaliado (Figuras 3 e 4).

Com relação ao tempo de permanência das plantas no escuro após a enxertia, os dois clones não apresentaram diferença estatística ( $P > 0,01$ ) entre os tratamentos segundo o procedimento estatístico de Leite e Oliveira (2002), indicando que a exposição ao escuro na condição *in vitro* não influenciou significativamente na resposta desta característica, na condição *ex vitro*.

Observou-se para os dois clones, comportamento semelhante quanto ao crescimento e vigor das plantas em relação às duas espécies de porta-enxerto avaliadas. Esses resultados indicam que não foi observado efeito diferenciado do porta-enxerto sobre o crescimento dos enxertos. Em trabalho com diferentes espécies de cactus, Estrada-Luna *et al.* (2002) obtiveram resultados positivos em plantas enxertadas dentro da mesma espécie, ao passo que as combinações de espécies distintas apresentaram tamanho do enxerto significativamente reduzido após a fase de aclimatização. Essas observações confirmam as variações de resposta que podem ocorrer em função da espécie estudada e das interações genéticas existentes entre as partes enxertadas. De acordo com Hartmann *et al.* (1997), de maneira geral, a proximidade genética aumenta as chances de pegamento e sobrevivência das plantas enxertadas, além de reduzir a possibilidade de rejeição em condições de campo.



**Figura 3** – Crescimento em altura das plantas enxertadas *in vitro* referente às combinações do enxerto Clone 1 com os porta-enxertos *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, avaliados aos 25, 32, 50 e 70 dias de idade, durante a etapa de aclimatização e rustificação *ex vitro*, em função dos diferentes tratamentos de tempos de permanência das plantas no escuro, na condição inicial *in vitro* (T1=0 dias, T2=7 dias, T3=14 dias e T4=21 dias).



**Figura 4** - Crescimento em altura das plantas enxertadas *in vitro* referente às combinações do enxerto Clone 2 com os porta-enxertos *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, avaliados aos 25, 32, 50 e 70 dias de idade, durante a etapa de aclimatização e rustificação *ex vitro*, em função dos diferentes tratamentos de tempos de permanência das plantas no escuro, na condição inicial *in vitro* (T1=0 dias, T2=7 dias, T3=14 dias e T4=21 dias).

#### 4. CONCLUSÕES

Com base na sobrevivência e no padrão de qualidade das mudas obtidas ao final de 70 dias na condição *ex vitro*, os resultados indicaram a eficiência da metodologia de aclimatização utilizada na propagação clonal de mudas dos dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* pela enxertia *in vitro*, adotada no presente trabalho.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, L.; AMÂNCIO, S. Effect of *ex vitro* conditions on growth and acquisition of autotrophic behavior during the acclimatisation of chesnut regenerated *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 95, p. 151-164, 2002.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimação de plantas: abordagens recentes**. In: TORRES, A. C.; LACORTE, C. (Eds.), Brasília: CNPH/EMBRAPA, ABCTP - NOTÍCIAS, nº 25, p. 2-12, 1996.

DONNELLY, D. J.; TISDALL, L. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Micropropagation of wood plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993, p. 153-166.

ERREA, P.; FELIPE, A.; HERRERO, M. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 272, p. 393-401, 1994.

ERREA, P.; GARAY, L.; MARÍN, J. A. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 135-141, 2001.

ESTRADA-LUNA, A. A.; LÓPEZ-PERALTA, C.; SORIANO-CÁRDENAS, E. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). **Scientia Horticulturae**, v. 92, p. 317-327, 2002.

EWALD, D.; KRETZSCHMAR, U. The influence of micrografting *in vitro* on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 249-252, 1996.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2nd. ed. England: Exegetics, 1993, v. 1. 575 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. ( Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI / EMBRAPA – CNPH, 1998. v. 1, p. 183–260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.

HERRERO, J. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. **Journal of Horticultural Science**, v. 26, n. 3, p. 186-237, 1951.

JONARD, R. Micrografting and its applications to tree improvement. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed), **Biotechnology in agriculture and forestry. v. 1: trees**. Springer-Verlag, Berlin, p. 31-48, 1986.

KADLECEK, P.; TICHÁ, I.; HAISEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHAFFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, v. 161, p. 695-701, 2001.

LEITE, H. G.; OLIVEIRA, F. H. T. Statistical procedure to test the identity of analytical methods. **Communication Soil Science Plant Analytical**, v. 33, p. 7-8, 2002.

MONTEUUIS, O. Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*. **Silvae Genetica**, v.43, n. 2-3, p. 91-95, 1994.

MOORE, R. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. **American Journal of Botany**, v. 71, n. 5, p. 752-758, 1984.

MOORE, R. Graft compatibilities *in vitro*. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry. v. 17: high-tech and micropropagation I**. Springer-Verlag, Berlin, p. 71-84, 1991.

MOORE, R.; WALKER, B. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograft in *Sedum telephoides* (crassulaceae). **American Journal of Botany**, v. 68, n. 6, p. 820-830, 1981a.

MOORE, R.; WALKER, B. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. II. A structural study of an incompatible heterograft between *Sedum telephoides* (crassulaceae) and *Solanum pennellii* (solanaceae), **American Journal of Botany**, v. 68, n. 6, p. 831-842, 1981b.

MUKHOPADHYAY, S.; JAISHREE RAI, B. C.; SHARMA, A. G.; SENGUPTA, R. K.; NATH, P. S. Micropropagation of darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting. **Journal of Horticultural Science**, v. 72, n. 3, p. 493-499, 1997.

MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. **HortScience**, v. 7, n. 2, p. 118-119, 1972.

NAVARRO, L. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to wood species. **Acta Horticulturae**, v. 227, p. 43-55, 1988.

PAIVA, L. V.; CARVALHO, S. A.; SOUZA, M. Limpeza clonal da laranjeira “seleta folha murcha” através da microenxertia *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 1341-1344, 1993.

PERRIN, Y.; LARDET, L.; ENJALRIC, F.; CARRON, M. P. Rejuvenation of mature clones of *Hevea brasiliensis* by *in vitro* micrografting. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 74, n. 3, p. 623-630, 1994.

PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. **Hortscience**, v. 22, n. 6, p. 1321-1324, 1987.

POSPISILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, n. 4, p. 481-497, 1999.

TRONCOSO, A.; LINAN, J.; CANTOS, M.; ACEBEDO, M. M. Feasibility and anatomical development of an *in vitro* olive cleft-graft. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 584-587, 1999.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos objetivos definidos no presente estudo, buscando avaliar a eficiência da enxertia *in vitro* na propagação vegetativa de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, os resultados obtidos permitiram concluir que a metodologia adotada mostrou-se eficiente, apresentando viabilidade de aplicação na propagação clonal de *Eucalyptus*. Os melhores resultados foram obtidos quando as plantas permaneceram entre 7 a 14 dias no escuro após a enxertia, mostrando efeitos positivos sobre o vigor e a sobrevivência das plantas após a etapa de aclimatização. O maior tempo no escuro (21 dias) resultou na perda de vigor e senescência em grande parte dos enxertos do clone 2. A partir da análise histológica, verificou-se que os processos de cicatrização do calo formado na região de injúria e reconstituição vascular das plantas enxertadas ocorreram aos 14 dias após a enxertia. No que se refere à etapa de aclimatização e rustificação *ex vitro*, os clones apresentaram resultados positivos quanto à sobrevivência das plantas enxertadas, apresentando crescimento vigoroso acompanhado de desenvolvimento e expansão foliar dos enxertos.

A variabilidade de resposta observada para as diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto é explicada pela qualidade dos enxertos obtidos bem como pelas interações genótípicas, anatômicas e fisiológicas estabelecidas entre as diferentes partes enxertadas. É importante considerar que a destreza e habilidade



manual durante a execução das enxertias mostraram-se fatores limitantes para a obtenção de resultados satisfatórios, revelando que, apesar de seus inúmeros benefícios, a enxertia *in vitro* exige alto grau de treinamento e mão-de-obra tecnicamente qualificada.