

Enxertia in vitro na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*

Fabiana Schmidt Bandeira⁽¹⁾, Aloisio Xavier⁽²⁾, Wagner Campos Otoni⁽³⁾ e José Maria Moreira Dias⁽⁴⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Viçosa (UFV), Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Av. PH Rolfs, s/nº, Campus Universitário CEP 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: fsbandeira@hotmail.com ⁽²⁾UFV, Dep. de Engenharia Florestal. E-mail: xavier@ufv.br ⁽³⁾UFV, Dep. de Biologia Vegetal. E-mail: wotoni@ufv.br ⁽⁴⁾UFV, Dep. de Fitotecnia. E-mail: jmmdias@ufv.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da enxertia in vitro na propagação de dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*. Foram utilizados porta-enxertos juvenis obtidos de sementes de *E. grandis* e *E. urophylla* germinadas in vitro. As plantas enxertadas apresentaram pegamento de até 93% aos 50 dias de idade para as combinações de enxerto e porta-enxerto. Quanto ao crescimento em altura, verificaram-se melhores resultados em relação ao porta-enxerto *E. urophylla*. A análise histológica das plantas enxertadas comprovou a eficiência do processo de cicatrização do calo formado na região de conexão, seguida da reconstituição vascular.

Termos para indexação: propagação clonal, rejuvenescimento clonal, cultura de tecidos.

In vitro grafting in the propagation of *Eucalyptus urophylla* and *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* and *E. grandis* hybrid clones. Juvenile stocks obtained from seeds of *E. grandis* and *E. urophylla* germinated in vitro were used. The grafted plants showed success up to 93% at 50 days for the scion and stock combinations. The highest final plant height values were observed when the stock was *E. urophylla*. Histologic analysis showed that cicatrized callus in the connection region was successfully followed by vascular recomposition in different combinations among scion with rootstocks.

Index terms: clonal propagation, clonal rejuvenation, tissue culture.

Introdução

A silvicultura clonal intensiva para espécies do gênero *Eucalyptus* tem apresentado bom desempenho no cenário florestal, permitindo a implementação de florestas de eucalipto em áreas anteriormente consideradas inadequadas, em virtude de 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, dada à sua rusticidade operacional. Entretanto, essa técnica apresenta-se inviável em clones de difícil enraizamento, em parte, devido ao grau de maturação dos propágulos utilizados. Com o desenvolvimento da microestaquia e

miniestaquia, essas técnicas proporcionaram melhorias no processo de produção de mudas, principalmente quanto ao enraizamento de alguns clones (Assis et al., 1992; Xavier & Comério, 1996; Xavier & Wendling, 1998; Wendling et al., 2000). No entanto, existem materiais genéticos de difícil propagação clonal, considerados recalcitrantes, até mesmo 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 (Pliego-Alfaro & Murashige, 1987) e florestais (Kretschmar & Ewald, 1994; Perrin et al., 1994; Ewald & Kretschmar, 1996). Segundo Huang et al. (1992), a enxertia in vitro seriada

pode ser adotada como técnica de rejuvenescimento, por proporcionar resultados com maior rapidez e eficiência em comparação à enxertia *ex vitro*, uma vez que propágulos com menores dimensões e mais juvenis são utilizados.

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 espécies frutíferas e florestais são mencionados por Kretzschmar & Ewald (1994), Monteuiis (1994, 1995), Ramanayake & Koor (1999), Troncoso et al. (1999), Mneey & Mantell (2001) e Thimmappaiah et al. (2002). Na obtenção de plantas de citrus livres de vírus, entre outros patógenos, Paiva et al. (1993) e Mukhopadhyay et al. (1997) alcançaram sucesso, 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 & Goldbach, 1988; Errea et al., 1994, 2001; Ermel et al., 1997; Errea, 1998; Estrada-Luna et al., 2002).

Este trabalho objetivou avaliar a eficiência da enxertia *in vitro*, na propagação de clones de *E. urophylla* e *E. grandis*.

Material e Métodos

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

Foram utilizados dois clones híbridos de *E. urophylla* e *E. grandis* provenientes da empresa V&M Florestal Ltda. e sementes dessas espécies, provenientes da região de Mogi Guaçu, SP, da empresa International Paper do Brasil.

Os clones utilizados são materiais genéticos de alta produtividade cujo melhoramento foi direcionado para a produção de celulose e papel. Outros aspectos considerados na seleção dos clones foi o fato de eles se encontrarem previamente estabelecidos *in vitro*, viabilizando, assim, a obtenção de fonte de explantes para a execução dos experimentos, além de serem de fácil propagação vegetativa, uma vez que o objetivo principal do tra-

balho consistiu em estabelecer uma metodologia para a enxertia *in vitro* e não avaliar o enraizamento.

O critério adotado na escolha dos porta-enxertos baseou-se, por sua vez, na proximidade botânica e genética em relação aos clones utilizados como enxertos, de forma a aumentar as chances de sucesso.

O trabalho foi composto de duas etapas: a primeira consistiu na germinação de sementes *in vitro* de *E. grandis* e *E. urophylla*, para a obtenção dos porta-enxertos e produção de gemas alongadas *in vitro* de dois clones de *E. urophylla* e *E. grandis*, para obtenção dos ápices caulinares utilizados como enxertos; a segunda etapa foi constituída da realização da enxertia *in vitro*.

Obtenção e preparo dos porta-enxertos

Inicialmente, as sementes de *E. grandis* e *E. urophylla* foram lavadas em água deionizada e autoclavada e, sob condições assépticas, desinfestadas em solução de álcool etílico 70% (v/v) por um minuto e imersas em solução de hipoclorito de sódio 5% (v/v) do produto comercial (Kintana), durante 15 minutos. Em seguida foram enxaguadas seis vezes em água deionizada, autoclavada e colocadas em meio WPM (Lloyd & McCown, 1980) na concentração total dos sais, acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 800 mg L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona), vitaminas WPM, sem reguladores de crescimento. Como agente gelificante, foram utilizados 5 g L⁻¹ de ágar granulado Merck, fundido durante o processo de autoclavagem do meio de cultura. O pH do meio foi ajustado para 5,7±0,1 (antes da adição do ágar) e, depois, foi realizada a autoclavagem a 120°C, pressão de 1,0 kgf cm⁻², durante 20 minutos.

De modo a controlar a contaminação endofítica, foram acrescidos ao meio nutritivo 300 mg L⁻¹ do antibiótico ticarcilina (Timentim), previamente esterilizado por filtração em membranas Milipore (0,20 µm de poro) e adicionado ao meio, em câmara de fluxo laminar, depois de sua autoclavagem.

Sob condições assépticas, foram inoculadas dez sementes por frasco de cultivo (60x100 mm), contendo 40 mL de meio de cultura. Depois da semeadura, os frascos foram vedados com filme transparente de PVC (Rolopac).

Depois da inoculação das sementes, os frascos de cultivo foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27±1°C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e irradiância de 40 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por tubos fluorescentes (luz do dia) Osram, 20 Watts.

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

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

Obtenção e preparo dos enxertos

Os clones utilizados foram propagados vegetativamente por 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. O meio de cultura adotado na fase de multiplicação foi constituído pelos sais minerais de MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas de White (White, 1943), ágar granulada Merck (5 g L^{-1}), $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP (6-benzilaminopurina) e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ANA (ácido α -naftalenoacético), com o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. As condições de incubação foram estabelecidas à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fornecida por tubos fluorescentes (luz do dia) Osram, 20 Watts.

Na obtenção dos ápices caulinares, foi utilizada a técnica de micropropagação via gemas axilares, conforme descrição anterior, sendo a modificação feita apenas com relação à concentração dos reguladores de crescimento no meio nutritivo, para $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ BAP com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ANA, e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BAP com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA para os clones 1 e 2, respectivamente, visando a promover o alongamento das partes aéreas multiplicadas em banco clonal. As condições de temperatura e fotoperíodo dentro da sala de crescimento permaneceram as mesmas.

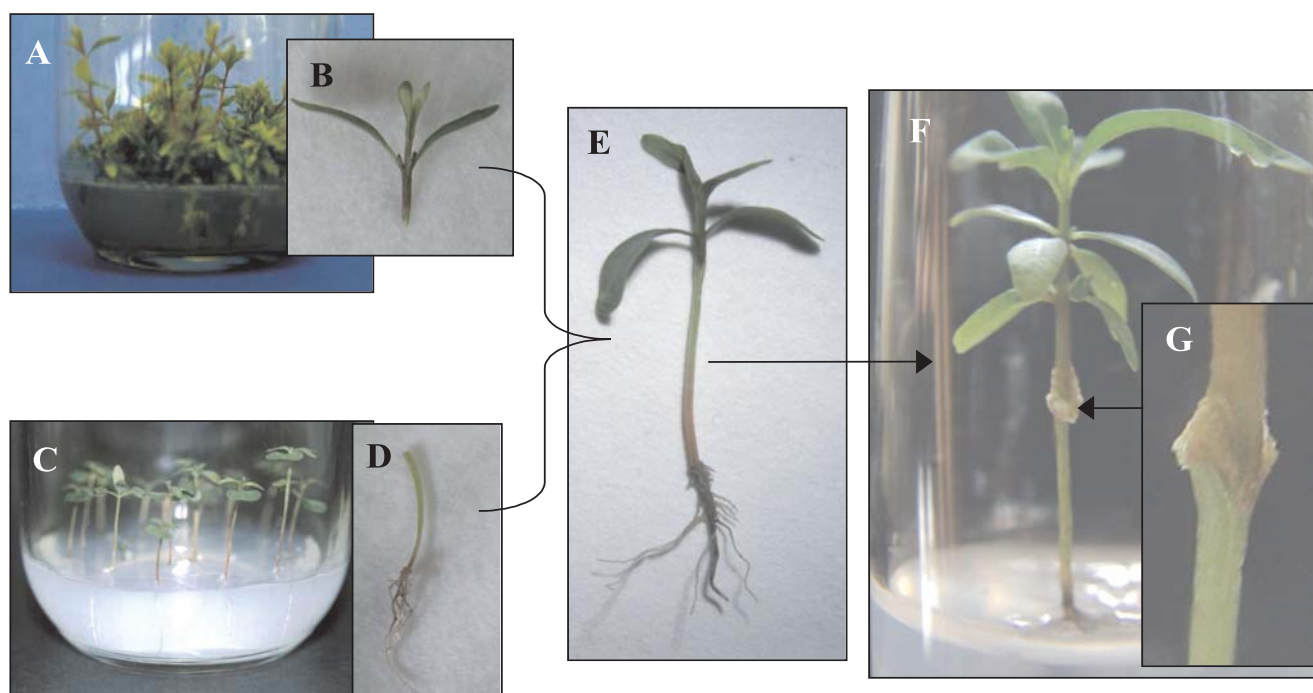


Figura 1. Esquema da enxertia in vitro em clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*. (A) gemas alongadas in vitro de clones híbridos de *E. urophylla* e *E. grandis* micropropagados, aos 30 dias de cultivo em meio de alongamento; (B) detalhe do ápice caulinar com o corte em bisel na base; (C) plântulas de *Eucalyptus* germinadas in vitro aos 45 dias; (D) detalhe do porta-enxerto (hipocótilo com raiz) depois da decapitação da parte aérea; (E) planta imediatamente depois da enxertia in vitro; (F) planta aos 35 dias depois da enxertia in vitro; (G) detalhe da região de união entre enxerto e porta enxerto.

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

Sob lupa binocular (Olympus SZ60), com aumento de dez vezes, as gemas alongadas *in vitro* foram retiradas dos frascos e colocadas sobre papel-filtro umedecido com água deionizada e autoclavada e, em seguida, foi realizado o corte em duplo bisel na porção basal do ápice caulinar.

Enxertia *in vitro*

Depois do 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 1 E). Em seguida, as plantas enxertadas foram inoculadas em meio de cultura constituído dos sais minerais de MS em sua concentração total, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP, vitaminas de White (White, 1943), sem a adição de reguladores de crescimento. Depois de ajustar o pH em 5,7±0,1, foram adicionados 5 g L⁻¹ de ágar granulada, 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 (25x150 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 sob condições ambientais de 27±1°C submetidas a 0 (controle), 7, 14 e 21 dias em regime de escuridão, depois da realização da enxertia. Decorrido o tempo de permanência no escuro, as plantas foram submetidas ao mesmo fotoperíodo do tratamento-controle, ou seja, 16 horas de luz e 8 horas de escuro e irradiância de 40 µmol m⁻² s⁻¹.

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada planta enxertada, uma repetição. Não foi possível a realização de análise estatística referente aos dados de porcentagem de pegamento apresentados, já que os dados não foram tomados em diferentes repetições por tratamento (cada planta foi considerada uma unidade amostral), não permitindo, portanto, o cálculo de médias e desvio-padrão. Outro aspecto consi-

derado, previamente à instalação dos experimentos, foi a dificuldade de obtenção das plantas enxertadas, dada a morosidade da técnica, o que tornaria a realização dos experimentos inviável, sob o ponto de vista operacional, justificando a obtenção dos dados a partir de uma amostra única por tratamento. Para o crescimento em altura das plantas, os dados foram previamente submetidos à análise de variância antes da aplicação do teste de Tukey.

Análise histológica

Foi realizado teste histoquímico para lignina, visando à confirmação da diferenciação do tecido vascular, reconectando enxerto e porta-enxerto. Amostras da região de união de plantas, com 43 dias do clone 1, enxertadas em *E. grandis*, foram coletadas e 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. Os cortes 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.

Avaliações

Aos 35 e 50 dias, foram realizadas avaliações das plantas enxertadas quanto ao porcentual de pegamento do enxerto. Depois de 50 dias de realização da enxertia, foi avaliada, também, a altura das plantas enxertadas em relação aos tratamentos de tempo de permanência no escuro.

Foi adotado o critério de níveis nas avaliações de porcentual de pegamento, caracterizados da seguinte maneira: nível 1, ausência de conexão ou conexão frágil, apresentando ausência de calejamento ou calejamento intenso na região da 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 se observou total união entre os tecidos do enxerto e porta-enxerto, apresentando baixa intensidade de calejamento na região do enxerto.

Resultados e Discussão

Durante a etapa inicial de estabelecimento dos enxertos in vitro, os dois clones de *E. urophylla* e *E. grandis* responderam positivamente à enxertia in vitro (Tabela 1).

Em relação ao percentual de pegamento total depois de 35 dias de cultivo in vitro, foram observados valores elevados nos dois clones. O clone 1 apresentou menor variação (73 a 99%) que o clone 2 (20 a 100%) em relação aos diferentes períodos de permanência das plantas no escuro depois da enxertia. Aos 35 dias, no clone 1, foram observados maiores percentuais de pegamento, aos zero e sete dias no escuro no porta-enxerto *E. urophylla* (93%), enquanto em *E. grandis*, os melhores resultados foram alcançados aos sete dias (99%). O clone 2 apresentou 100 e 94% de pegamento total em relação ao tempo de sete dias no escuro, quando enxertado em *E. grandis* e *E. urophylla*, respectivamente.

Depois de 50 dias in vitro, observou-se, nos dois clones, redução nos valores totais de pegamento, em virtude da mortalidade de algumas plantas enxertadas. Apesar disso, esses percentuais mantiveram-se elevados.

Quanto ao maior tempo no escuro (21 dias), os clones apresentaram percentuais de pegamento inferiores, principalmente o clone 2, que obteve 20% sobre o porta-enxerto *E. urophylla* e 40% sobre *E. grandis*.

Os resultados 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 em 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 (Feucht & Schmid, 1979). Segundo Taiz & Zeiger (1991), a regeneração do tecido vascular depois de uma lesão é controlada pela auxina produzida pela folha jovem, localizada diretamente acima do local danificado.

Esses resultados contrariam Monteuiis (1994) que, em trabalho com *Picea abies*, observou resultados positivos ao manter plantas enxertadas pelo mesmo período em regime de escuridão, logo depois da enxertia. Segundo esse autor, esses resultados podem ser atribuídos à degradação da auxina sintetizada nos

Tabela 1. Porcentagem de pegamento de enxertos in vitro referentes às combinações dos enxertos de dois clones híbridos de *E. urophylla* e *E. grandis* com porta enxertos de *E. urophylla* e *E. grandis*, após tratamentos de tempo de permanência no escuro, avaliados aos 35 e 50 dias depois da realização da enxertia, de acordo com a intensidade de conexão⁽¹⁾.

Porta-enxerto	Dias no escuro	Pegamento dos enxertos in vitro							
		35 dias				50 dias			
		1	2	3	Total	1	2	3	Total
<i>E. urophylla</i>	0	20	40	33	93	Clone 1			
	7	33	13	47	93	7	27	53	87
	14	0	20	60	80	20	7	53	80
	21	7	33	33	73	0	20	60	80
<i>E. grandis</i>	0	13	40	27	80	7	27	40	74
	7	13	13	73	99	0	7	80	87
	14	13	27	53	93	7	13	67	87
	21	13	13	60	86	0	13	60	73
<i>E. urophylla</i>	0	0	27	60	87	Clone 2			
	7	27	20	47	94	0	27	60	87
	14	20	7	47	74	27	13	53	93
	21	0	7	13	20	7	7	47	61
<i>E. grandis</i>	0	0	13	73	86	0	7	80	87
	7	13	20	67	100	7	13	73	93
	14	20	0	27	47	13	0	27	40
	21	20	13	27	60	7	0	33	40

⁽¹⁾1: ausência de conexão ou conexão frágil; 2: conexão regular; 3: conexão excelente (n=15).

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.

Os valores porcentuais do estabelecimento dos enxertos *in vitro*, obtidos em *Eucalyptus*, encontram-se próximos aos observados para outras espécies lenhosas: *Pistacia vera* (Abousalim & Mantell, 1992), *Olea europaea* (Troncoso et al., 1999), e *Anacardium occidentale* (Mnoney & Mantell, 2001; Thimmappaiah et al., 2002).

O baixo rendimento observado no pegamento das plantas enxertadas no escuro, devido à mortalidade, pode ser evitado de acordo com a habilidade e a rapidez durante a execução das enxertias. Segundo Navarro (1988), 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, já que, nos dois clones, foram observados maiores porcentuais de pegamento considerado morfológicamente excelente e menores porcentuais de conexão frágil e regular (Tabela 1). Estas observações são relevantes, uma vez que o nível de pegamento excelente foi considerado o padrão, em termos de respostas aos danos sofridos pelas células e tecidos do enxerto e porta-enxerto, no momento da enxertia.

O pegamento excelente 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. As conexões frágil (Figura 2 A) e regular (Figura 2 B) foram consideradas, 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, depois da enxertia. Observou-se, nessas conexões, respectivamente, a inexistência de calo na região de junção (Figura 2 D), indicando que não houve resposta morfogênica quanto à cicatrização dos tecidos na região do enxerto, e uma alta intensidade de calejamento (Figura 2 E), resposta também indesejável, haja vista que a proliferação excessiva de calo nesta região pode ser considerada um reflexo da fragilidade da conexão vascular observada.

A proliferação de calo na região enxertada caracteriza o estágio inicial verificado na primeira semana de-

pois da enxertia *in vitro* (Errea et al., 1994). Segundo Barnett & Weatherhead (1988) e Hartmann et al. (1997), este evento, apesar de ocorrer como mecanismo de defesa da planta, visando a prevenir a entrada de patógenos, constitui uma resposta natural dos vegetais para a cicatrização dos tecidos danificados. Contudo, foi observado que, para o 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, de modo a apenas reconstituir a região danificada, estabelecendo, assim, a comunicação celular entre as partes enxertadas. A proliferação excessiva de calo, em alguns casos, indicou a formação de união frágil, e não necessariamente a perfeita reconexão vascular entre os tecidos do enxerto e porta-enxerto, seja pela qualidade dos enxertos 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 melhor crescimento e desenvolvimento dos enxertos. Esses resultados corroboram os encontrados por Mnoney & Mantell (2001) e Thimmappaiah et al. (2002), os quais verificaram 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 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 sistema radicular completamente formado, além de eliminar a etapa posterior de enraizamento das plantas enxertadas, pode ter proporcionado efeito favorável no pegamento e no crescimento dos enxertos, os quais, já com 50 dias, mostravam-se aptos à transferência para a condição *ex vitro*.

Considerando os resultados de pegamento alcançados nas plantas enxertadas dos dois clones de *E. urophylla* e *E. grandis*, pode-se dizer que a enxertia *in vitro* apresenta potencial e viabilidade de aplicação na propagação clonal de *Eucalyptus*. Entretanto, tratando-se de uma técnica morosa, exige alto grau de destreza e habilidade no manuseio dos explantes.

Com relação ao crescimento em altura das plantas enxertadas in vitro, no clone 1, observaram-se diferenças significativas entre os porta-enxertos apenas nos tempos de zero e 21 dias de permanência no escuro (Tabela 2). Quanto ao clone 2, enxertado em *E. urophylla*, foram observadas diferenças significativas entre zero, sete e 21 dias no escuro, e no porta-enxerto *E. grandis*, nos tempos de zero e 21 dias, sen-

do estatisticamente iguais entre zero e sete dias e 14 e 21 dias.

Em relação ao tempo de permanência das plantas no escuro, para o clone 1, não foram observadas, nas duas espécies de porta-enxerto utilizadas, diferenças significativas entre zero, sete e 14 dias. No entanto, o maior período em regime de escuridão (21 dias) resultou em menor crescimento das plantas, indicando que o longo

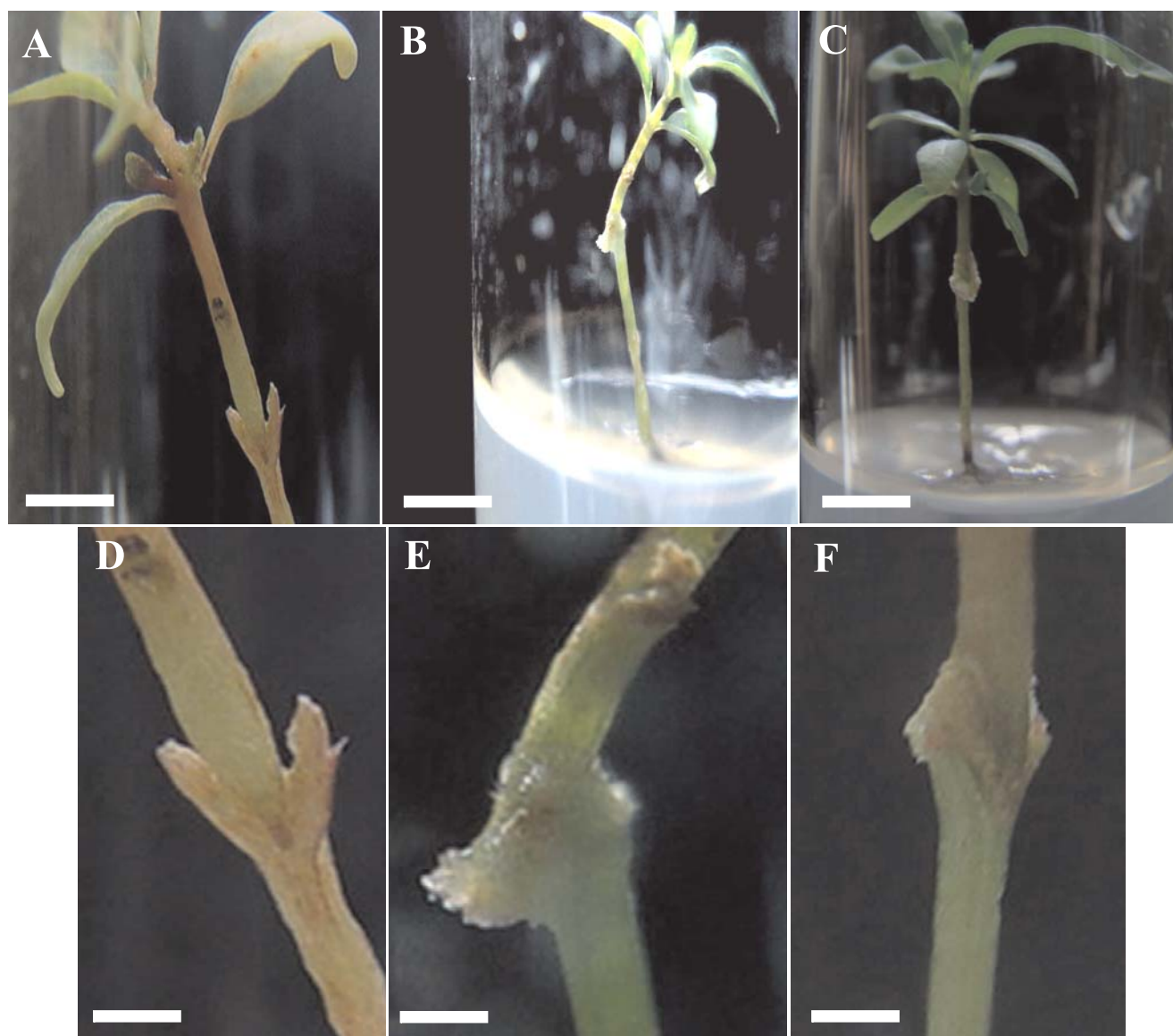


Figura 2. Níveis de pegamento dos clones híbridos de *E. urophylla* e *E. grandis* enxertados in vitro; A: nível de pegamento 1, caracterizado pela ausência de conexão (barra = 4 mm); B: nível de pegamento 2, caracterizado pelo desalinhamento lateral de uma das partes do enxerto (barra = 7,5 mm); C: 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).

período na ausência de luz afetou a dinâmica de crescimento e desenvolvimento das plantas. Quanto ao efeito dos porta-enxertos, observou-se melhor resposta no porta-enxerto *E. urophylla*, exceto nos tempos de sete e 14 dias no escuro, os quais não apresentaram diferenças estatísticas.

Em relação ao clone 2, 21 dias foi um período excessivo em escuridão para ambos os porta-enxertos, bem como 14 dias, quando comparado à ausência de escuro para *E. grandis* como porta-enxerto (Tabela 2). Quanto aos porta-enxertos, de maneira semelhante ao observado no clone 1, melhores resultados foram obtidos em plantas 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. Além disso, as variações de resposta, observadas entre os clones e os porta-enxertos, podem ser atribuídas às diferentes interações genéticas e fisiológicas estabelecidas entre as partes enxertadas.

A coloração com floroglucina evidenciou a diferenciação de elementos de vaso e a conseqüente reconstituição vascular (Figura 3). Observou-se a continuidade vascular ligando os tecidos do enxerto aos do porta-enxerto. O restabelecimento da continuidade vascular na zona de interface é considerado por Yeoman & 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

Tabela 2. Altura (cm) das plantas enxertadas in vitro referentes às combinações dos enxertos de dois clones híbridos de *Eucalyptos urophylla* e *E. grandis* com os porta-enxertos de *E. urophylla* e *E. grandis*, após diferentes períodos de permanência no escuro, avaliadas 50 dias depois da realização da enxertia⁽¹⁾.

Porta-enxerto	Dias no escuro			
	0	7	14	21
	Clone 1			
<i>E. urophylla</i>	3,4Aa	3,2ABa	3,2ABa	3,0Ba
<i>E. grandis</i>	3,1Ab	3,1Aa	3,1Aa	2,7Bb
	Clone 2			
<i>E. urophylla</i>	3,7Aa	3,1Ca	3,5ABa	3,4Ba
<i>E. grandis</i>	2,9Ab	2,8ABb	2,5Bb	2,5Bb

⁽¹⁾Médias seguidas por 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 (n = 15).

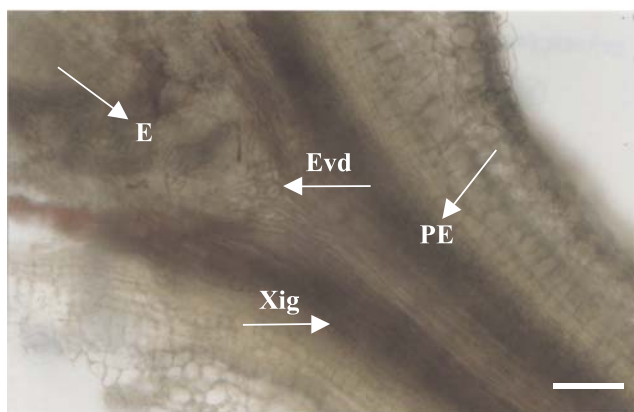


Figura 3. Análise histológica da enxertia in vitro em clone híbrido de *E. urophylla* e *E. grandis*, em corte longitudinal evidenciando a xilogênese em enxerto com 43 dias (barra = 120 µm); E, enxerto; Evd, elementos de vaso em diferenciação; PE, porta-enxerto; Xig, xilogênese na região de união entre as partes enxertadas.

não está necessariamente relacionado ao sucesso do pegamento dos enxertos e tampouco à compatibilidade e incompatibilidade entre os tecidos envolvidos. No entanto, Moore & Walker (1981) e Asante & 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.

Em *Eucalyptus*, confirmou-se a reconstituição vascular das plantas enxertadas depois da coloração com floroglucina ácida, indicando uma união perfeita e sem sinais de rejeição, quando comparada aos estudos desenvolvidos em outras espécies lenhosas. Embora incipientes, esses resultados confirmam a eficiência de aplicação da enxertia in vitro na propagação vegetativa de clones de *Eucalyptus*.

Conclusões

1. A metodologia de enxertia in vitro avaliada pode ser estabelecida de maneira eficiente, nos dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*.
2. Não há evidência em favor de nenhuma das espécies de porta-enxerto em relação à eficiência de pegamento.
3. O pegamento e o crescimento em altura dos enxertos são mais eficientes quando as plantas permanecem sete dias no escuro e sem exposição ao escuro, respectivamente.

4. O processo de cicatrização e de reconexão vascular das plantas enxertadas confirma o sucesso da enxertia in vitro dos clones de *Eucalyptus*.

Referências

- ABOUSALIM, A.; MANTELL, S.H. Micrografting of pistachio (*Pistacia 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, p.781-790, 1997.
- ASSIS, T.F.; ROSA, O.P.; GONÇALVES, S.I. Propagação por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. **Anais**. Santa Maria: UFSM, 1992. p.824-836.
- 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.; POËSSEL, 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. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit tree species. **Scientia Horticulturae**, v.74, p.195-205, 1998.
- ERREA, P.; FELIPE, A.; HERRERO, M. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. **Journal of Experimental Botany**, v.45, 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.; CÁRDENAS-SORIANO, 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**. 6th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 1997. 770p.
- HERRERO, J. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. **Journal of Horticultural Science**, v.26, 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: model for phase reversal of trees. **Plant Physiology**, v.98, p.166-173, 1992.
- JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman, 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 of the International Plant Propagators' Society**, v.30, p.421-427, 1980.
- 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, p.91-95, 1994.
- MONTEUUIS, O. In vivo grafting and in vitro micrografting of *Acacia mangium*: impact of ortet age. **Silvae Genetica**, v.44, p.190-193, 1995.
- MOORE, R. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. **American Journal of Botany**, v.71, 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, p.820-830, 1981.
- MUKHOPADHYAY, S.; RAI, J.; SHARMA, B.C.; GURUNG, A.; SENGUPTA, R.K.; NATH, P.S. Micropropagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting. **Journal of Horticultural Science**, v.72, 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, p.118-119, 1972.
- NAVARRO, L. Application of shoot-tip grafting in vitro to woody 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.** 2003. 53p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- PAIVA, L.V.; CARVALHO, S.A. de; SOUZA, M. de. Limpeza clonal da laranja "seleta folha murcha" através da microenxertia in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, p.1341-1344, 1993.
- PERRIN, Y.; LARDET, L.; ENJALRIC, F.; CARRON, M.P. Rejuvenation of mature clones of *Hevea brasiliensis* (Muëll. Arg.) by in vitro micrografting. **Canadian Journal of Plant Science**, v.74, p.623-630, 1994.
- PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks in vitro. **HortScience**, v.22, p.1321-1324, 1987.

- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; KOVOOR, A. Predicting frequency distributions in crops of carrot (*Daucus carota* L.) and red beet (*Beta vulgaris* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.74, p.265-268, 1999.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 1st ed. Redwood City: Benjamin/Cummings Pub., 1991. 559p.
- THIMMAPPAIAH; PUTHRA, G.T.; ANIL, S.R. In vitro grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, v.92, p.177-182, 2002.
- TRONCOSO, A.; LINAN, J.; CANTOS, M.; ACEBEDO, M.M.; RAPOPORT, H.F. Feasibility and anatomical development of an in vitro olive cleft-graft. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.74, p.584-587, 1999.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.20, p.9-16, 1996.
- XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de Eucalyptus**. Viçosa: SIF, 1998. 10p. (SIF. Informativo técnico, 11).
- YEOMAN, M.M.; BROWN, R. Implications of the formation of the graft union for organization 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. (Ed.). **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley-Interscience, 1971. p.19-32.
- WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J.M.; PIRES, I.E.; ANDRADE, H.B. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v.24, p.181-186, 2000.
- 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.

Recebido em 29 de dezembro de 2004 e aprovado em 27 de julho de 2005