

ACLIMATIZAÇÃO *EX VITRO* DE PLANTAS PROPAGADAS PELA ENXERTIA *IN VITRO* DE CLONES DE *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*¹

Fabiana Schmidt Bandeira², Aloisio Xavier³, Wagner Campos Otoni⁴ e Elisonete Ribeiro Garcia Lani⁵

RESUMO – Este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência e o crescimento 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 as condições *ex vitro*, avaliando-se a sobrevivência e o crescimento em altura das mudas. Elevados índices de sobrevivência dos enxertos (87%) foram observados aos 70 dias na condição *ex vitro*, assim como adequado 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 vegetativa, propagação *in vitro* e cultura de tecidos.

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

ABSTRACT – This work aimed to evaluate the survival and growth of two *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* clones obtained by *in vitro* grafting technique during the *ex vitro* acclimatization stage. Grafted plants were obtained from rootstocks from seedlings of *in vitro*-germinated *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*, and apexes from stem tips (average 10 mm) of two micropropagated *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis* clones. After 50 days of *in vitro* culture, the plants were transferred to *ex vitro* conditions and plant survival and growth were evaluated. High grafting survival rates (87%) were recorded at 70 days in the *ex vitro* condition, as well as good height growth. Clones showed similar performance in relation to the used stocks, indicating that the chosen acclimatization process was efficient.

Keywords: Vegetative propagation, *in vitro* propagation and tissue culture.

1. INTRODUÇÃO

A enxertia *in vitro* consiste em uma técnica de propagação vegetativa com aplicação em diversas espécies lenhosas, especialmente em frutíferas e florestais,

atendendo a diferentes propósitos. Esta técnica se baseia em enxertar, sob 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).

¹ Recebido em 09.10.2006 e aceito para publicação em 29.03.2007

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal de Viçosa - UFV. E-mail: <fsbandeira@hotmail.com>.

³ Departamento de Engenharia Florestal da UFV. E-mail <xavier@ufv.br>.

⁴ Departamento de Biologia Vegetal da UFV. E-mail <wotoni@ufv.br>.

⁵ Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO. E-mail <elisonete@ufv.br>.

Dentre as suas aplicações, merecem destaque a possibilidade de detecção precoce de viroses (PATHIRANA e MCKENZIE, 2005), de limpeza clonal, obtendo-se plantas isentas de vírus (MURASHIGE et al., 1972; PAIVA et al., 1993; MUKHOPADHYAY et al., 1997; KATOH et al., 2004; SUAREZ et al., 2005); e os estudos relacionados à incompatibilidade entre as partes enxertadas (MOORE e WALKER, 1981a,b; MOORE, 1984; ERREA et al., 1994, 2001), como forma de propagação em protocolos de regeneração de plantas (PEÑA et al., 1995; RAHARJO e LITZ, 2005; JIN et al., 2006), bem como o rejuvenescimento em espécies lenhosas de difícil enraizamento, quando realizado de forma seriada (PLIEGRO-ALFARO e MURASHIGE, 1987; PERRIN et al., 1994; EWALD e KRETZSCHMAR, 1996; ONAY et al., 2004; CHABUKSWAR e DEODHAR, 2006).

Em *Eucalyptus*, a propagação de plantas pela enxertia *in vitro* pode compreender quatro etapas principais, as quais são 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, em que é realizada a abertura da fenda no porta-enxerto; e pela aclimatização das plantas na condição *ex vitro* (BANDEIRA, 2006).

A fase de transferência das plantas estabelecidas *in vitro*, visando à 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 a autotrófica, sofrendo 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 a casa de vegetação na implica 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 esse período.

O ambiente *in vitro* é caracterizado por uma atmosfera saturada, baixa irradiância ($12 \text{ a } 70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), temperatura relativamente alta e constante (20 a 28 °C), reduzidas

trocias 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; GRATAPAGLIA e MACHADO, 1998).

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 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; GRATAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Navarro (1988) comentou que, para a 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 as literaturas sobre a propagação vegetativa pela enxertia *in vitro*, principalmente referindo-se à fase de aclimatização e rustificação de plantas enxertadas *in vitro*. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência e o crescimento 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. MATERIALE 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 1 cm de comprimento e apresentando dois a três pares de folhas totalmente expandidas, extraídos de clones mantidos pela micropropagação via proliferação de gemas axilares (BANDEIRA, 2006). Em condições assépticas e sob lupa binocular (Olympus SZ60) com aumento de 10 vezes, foi realizado um corte em duplo bisel na porção basal do ápice caulinar. Em seguida, com o auxílio de pinça e bisturi, executou-se a enxertia *in vitro* por garfagem, caracterizada pela abertura da fenda, no topo do porta-enxerto, na qual foi inserido o enxerto. Não foi empregado qualquer tipo de fitilho ou similar no ponto onde foi realizada a enxertia (Figura 1).

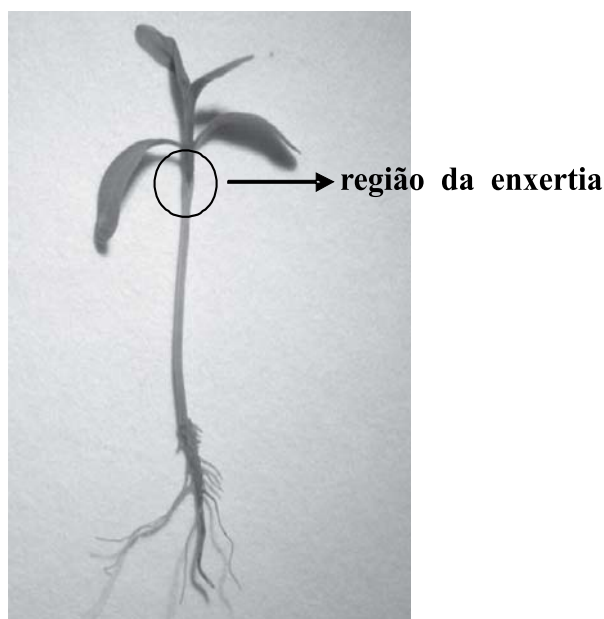


Figura 1 – Planta enxertada *in vitro* de clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* imediatamente após a enxertia (barra = 12 mm).

Figure 1 – *In vitro* grafted plant of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* clone immediately after grafting (bar = 12 mm).

As plantas enxertadas foram acondicionadas em sala de crescimento à temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, onde permaneceram até os 50 dias após a enxertia. Os enxertos foram submetidos a diferentes tratamentos de permanência em regime de escuridão após a enxertia. O tratamento T1 foi o controle, correspondendo a 0 dia no escuro; o T2, a 7 dias no escuro; o T3, a 14 dias no escuro; e o T4, 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 h de luz e 8 h de escuro, com irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fornecida por tubos fluorescentes, luz do dia, Osram®, 20 Watts), até completar a etapa *in vitro* (50 dias). As plantas enxertadas *in vitro* foram avaliadas, durante a fase em que permaneceram em condições assépticas, quanto à porcentagem de pegamento, em que se adotou o critério de níveis de pegamento, assim caracterizados: **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 taxas de calejamento intensa e média; e **nível 3**, conexão excelente, na qual se observou total união entre os tecidos do enxerto e do porta-enxerto, apresentando baixa taxa de calejamento na região do enxerto.

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^3 , contendo como substrato vermiculita de granulometria média e adubação composta por 8 kg m^{-3} 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 sete dias, sendo nessa 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⁻¹, cloreto de potássio 3,33 g L⁻¹, sulfato de zinco 0,22 g L⁻¹, sulfato de cobre 0,22 g L⁻¹, sulfato de manganês 0,22 g L⁻¹ e ácido bórico 0,39 g L⁻¹), durante toda a fase de aclimatização e rustificação *ex vitro*.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada planta enxertada uma repetição. Adotou-se o procedimento estatístico de Leite e Oliveira (2002), para verificar se o tempo em que as plantas enxertadas permaneceram no escuro, após a enxertia *in vitro*, influenciou significativamente a fase de aclimatização *ex vitro*.

Dessa forma, com base no objetivo proposto neste trabalho, as avaliações foram 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. 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 na fase de aclimatização, resultando em até 87% de sobrevivência das plantas ao final do período de avaliação *ex vitro* (Quadro 1). Nos dois porta-enxertos avaliados, o menor percentual de sobrevivência (20%) foi observado no clone 2. Esse resultado é atribuído à mortalidade após a saída da casa de vegetação, causada por estresses fisiológicos sofridos pelas plantas na casa de sombra e a pleno sol, em que 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. Na transferência

para o viveiro, observou-se alta mortalidade, principalmente do 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.

A mortalidade observada nos dois clones após a transferência para a 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, diminuída 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 mesófilo. O aparelho fotossintético ineficiente e o retardo no desenvolvimento da cutícula, da 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-transplante. Nesse aspecto, a aclimatização constitui 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 e AMÂNCIO, 2002).

Segundo Pospisilová et al. (1999) e Kadlecěk 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, destacam-se o desenvolvimento da cutícula e a cera epicuticular e do mecanismo de regulação estomática da transpiração, conduzindo à estabilização do "status" hídrico da planta.

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

Table 1 – *Ex vitro* survival of *in vitro* grafted plants of the graft combinations of two *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* clones with *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* rootstocks affected by the incubation period in the dark (days) at 25, 32, 50 and 70 days

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

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 transplante 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 esse 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 nos 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%) nos melhores tratamentos, 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 se mostraram fisiologicamente ativas, fato constatado pelo crescimento, desenvolvimento e expansão foliar dos enxertos nessa 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 aclimatização *ex vitro* (barra = 35 mm).

Figure 2 – *In vitro* grafted-derived plant of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* clone at 70 days growing under full sunlight, after *ex vitro* acclimatization (bar = 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 relataram 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) comentou 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, em que destreza e habilidade manual são consideradas fatores limitantes para a obtenção de respostas positivas, a enxertia *in vitro* nas condições experimentais adotadas neste estudo indicou viabilidade de aplicação no que se refere à obtenção de mudas clonais ao final da etapa de aclimatização e rustificação nos 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 genotípicas, bioquímicas e fisiológicas entre as diferentes partes enxertadas (HERRERO, 1951; MONTEUUIS, 1994; 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 (Figura 3).

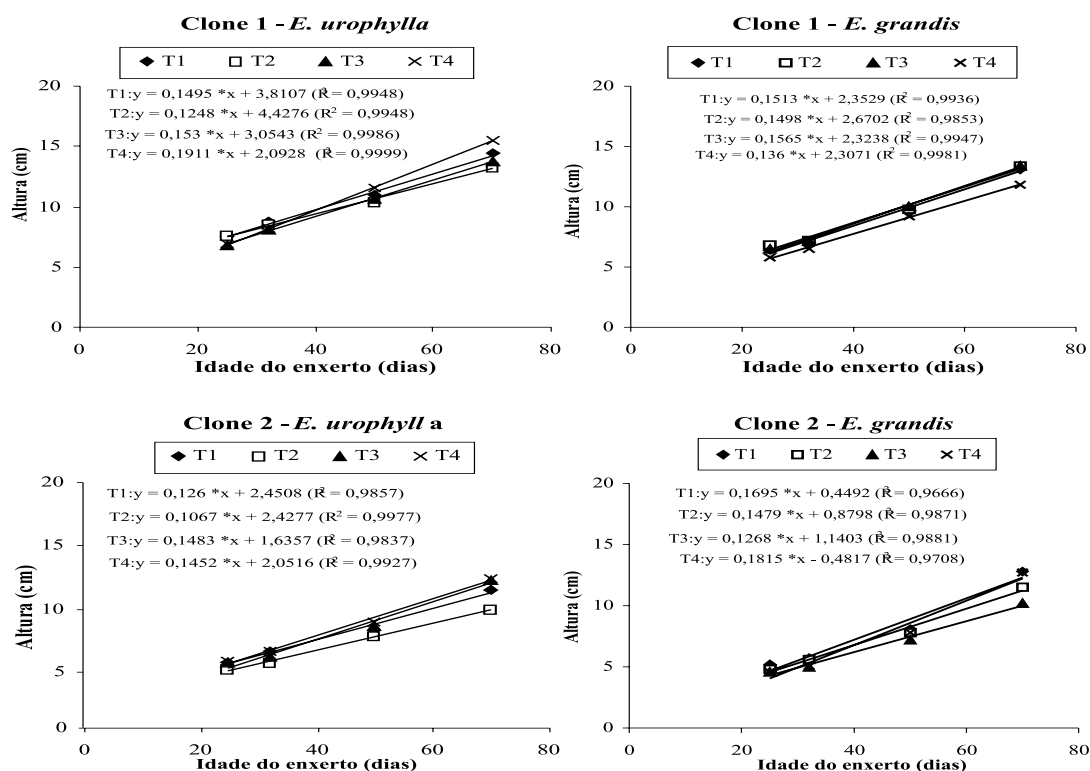


Figura 3 – Crescimento em altura das plantas enxertadas *in vitro* referente às combinações dos enxertos Clone 1 e Clone 2 com os porta-enxertos *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, avaliados aos 25, 32, 50 e 70 dias de idade, durante as etapas de aclimatização e rustificação *ex vitro*, em função dos diferentes tratamentos de tempos de permanência das plantas no escuro, na condição inicial *in vitro* (T1 = 0; T2 = 7; T3 = 14; e T4 = 21 dias).

Figure 3 – Height growth of *in vitro* grafted plants of the graft combinations of Clone 1 and Clone 2 with *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* rootstocks evaluated at 25, 32, 50 and 70 days, during *ex vitro* acclimatization phase affected by incubation period in the dark (T1 = 0; T2 = 7; T3 = 14; and T4 = 21 days).

Quanto 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 a resposta dessa característica, na condição *ex vitro*.

Observou-se nos dois clones comportamento semelhante quanto ao crescimento em altura e vigor das plantas em relação às duas espécies utilizadas como porta-enxerto, indicando que não houve efeito 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 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.

Vale ressaltar que estudos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas enxertadas *in vitro*, em condições de campo, devem ser conduzidos futuramente e tornam-se de fundamental importância, tendo em vista o alto índice de rejeição apresentado em algumas espécies lenhosas, podendo, em muitas situações, levar à morte das plantas e acarretar em prejuízos econômicos de proporções consideráveis.

4. CONCLUSÕES

Com base na sobrevivência e 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 neste trabalho.

5. AGRADECIMENTOS

À International Paper, pelo fornecimento das sementes; à V&M Florestal, pela cessão de uso dos clones utilizados neste trabalho; e à Coordenadoria

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

6. REFERÊNCIAS

- BANDEIRA, F. S. et al. Enxertia *in vitro* na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.223-232, 2006.
- 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. **Aclimatação de plantas: abordagens recentes**. In: TORRES, A. C.; LACORTE, C. (Eds.) Brasília: CNPH/Embrapa, ABCTP, 1996. p.2-12. (Notícias, 25).
- CHABUKSWAR, M. M.; DEODHAR, M. A. Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.194-199, 2006.
- 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.
- R. **Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.5, p.773-781, 2007

- 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**. 2. ed. England: Exegetics, 1993. v.1. 575p.
- 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. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: 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, n.3, p.186-237, 1951.
- JIN, S. et al. An efficient grafting system for transgenic plant recovery in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.85, p.181-185, 2006.
- JONARD, R. Micrografting and its applications to tree improvement. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed), **Biotechnology in agriculture and forestry: Trees**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. v.1. p.31-48.
- KADLECEK, P. et al. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, v.161, p.695-701, 2001.
- KATOH, N. et al. Production of virus-free plants from virus-infected sweet pepper by *in vitro* grafting. **Scientia Horticulturae**, v.100, p.1-6, 2004.
- 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: High-tech and micropropagation I**. Springer-Verlag, Berlin, 1991. v.17. p.71-84.
- 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. et al. 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. et al. 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.
- ONAY, A. et al. *In vitro* micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p.215-219, 2004.
- 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.
- R. **Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.5, p.773-781, 2007

PATHIRANA, R.; McKENZIE, J. Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.11-18, 2005.

PEÑA, L. et al. High efficiency agrobacterium-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v.104, p.183-191, 1995.

PERRIN, Y. et al. 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.

POSPÍŠILOVÁ, J. et al. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v.42, n.4, p.481-497, 1999.

RAHARJO, S. H. T.; LITZ, R. E. Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.82, p.1-9, 2005.

SUAREZ, I. E. et al. Micrografting of ASBVd-infected avocado (*Persea americana*) plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.80, p.179-185, 2005.

TRONCOSO, A. et al. 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.