

RAÍSSA EIKO NAGAOKA

**APLICABILIDADE DA ENXERTIA *in vitro* NO
REVIGORAMENTO/REJUVENESCIMENTO CLONAL DE *Eucalyptus* spp.**

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

Orientador: Aloisio Xavier
Coorientador: Wagner Campos Otoni

VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

N147a
2023

Nagaoka, Raíssa Eiko, 1989-

Aplicabilidade da enxertia in vitro no
revigoramento/rejuvenescimento clonal de *Eucalyptus* spp. /
Raíssa Eiko Nagaoka. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (53 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Aloísio Xavier.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Engenharia Florestal, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.101>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Eucalipto - Propagação por estaquia. 2. Eucalipto -
Propagação in vitro. 3. Eucalipto - Enxertia. 4. Eucalipto -
Clonagem. I. Xavier, Aloísio, 1965-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Engenharia Florestal. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal. III. Título.

GFDC adapt. CDD 22. ed. 634.9232328

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

RAÍSSA EIKO NAGAOKA

**APLICABILIDADE DA ENXERTIA IN VITRO NO
REVIGORAMENTO/REJUVESCIMENTO CLONAL DE *Eucalyptus* spp.**

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

APROVADA: 08 de dezembro de 2023.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente
RAÍSSA EIKO NAGAOKA
Data: 04/03/2024 11:49:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Raíssa Eiko Nagaoka Autora



Documento assinado digitalmente
ALOISIO XAVIER
Data: 04/03/2024 15:13:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Aloisio Xavier Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal e ao Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela realização do curso de mestrado e deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Sociedade de Investigações Florestais (SIF), pela concessão de bolsa de estudo.

À empresa CMPC-Celulose Rio Grandense, por ceder o material genético base utilizado e suporte financeiro neste estudo.

Ao meu orientador Prof. Aloisio Xavier e ao meu coorientador Wagner Otoni, sou grata pela orientação e oportunidade de estar no laboratório, ao qual me proporcionou tantos aprendizados. Obrigada pela paciência, confiança e pelos conselhos.

Aos componentes da banca examinadora, por aceitarem fazer parte deste trabalho e contribuições.

À Ana Claudia, colega de trabalho, agradeço por esses quase três anos de convívio, amizade, por compartilhar todo o conhecimento e por nunca desistir de mim.

Ao Rafael, amigo, colega de profissão e estagiário, por toda a ajuda com os experimentos em viveiro e por ser sempre tão solícito.

Aos colegas e amigos em especial: Adriely, Edgar, Jefferson e Pedro.

Ao Marciel por auxiliar nas análises dos dados.

Aos amigos dos Laboratórios BioCafé e Patologia Florestal.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

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

BIOGRAFIA

RAÍSSA EIKO NAGAOKA, filha de Luiz Takuo Nagaoka e Maria Isabel de Carvalho Nagaoka, nasceu em 01 de abril de 1989, no município de Capão Bonito, Estado de São Paulo, Brasil.

Concluiu o 1º grau em 2003, e o 2º grau em 2006, no Colégio Sacre Couer Des Enfants em Capão Bonito, São Paulo.

Em março de 2009, ingressou no Curso de Engenharia Florestal da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), campus Irati, Paraná, concluindo o curso em dezembro de 2013.

Em maio de 2021, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Magister Scientiae* em dezembro de 2023.

RESUMO

NAGAOKA, RAÍSSA EIKO, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2023 **Aplicabilidade da enxertia in vitro no revigoramento/rejuvenescimento clonal de *Eucalyptus* spp.** Orientador: Aloisio Xavier. Coorientador: Wagner Campos Otoni.

O *Eucalyptus* spp. é uma das espécies mais estudadas dentro da técnica de cultivo in vitro, principalmente com o objetivo de revigoramento e de rejuvenescimento clonal. No entanto, ainda existem lacunas de conhecimento, devido às necessidades específicas de cada material genético. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo avaliar a enxertia in vitro como técnica de revigoramento e de rejuvenescimento, visando à restauração parcial da competência rizogênica na propagação vegetativa de clone de *Eucalyptus* spp. Os objetivos específicos foram avaliar: 1) a influência de dois porta-enxertos de *Eucalyptus saligna* (ES1 e ES2); 2) o efeito da enxertia no revigoramento/rejuvenescimento de um clone de *Eucalyptus saligna* (C1); 3) a influência de duas qualidades espectrais de luz no cultivo in vitro dos enxertos; 4) e o efeito da técnica de enxertia seriada in vitro na produção de brotações e enraizamento das microestacas, obtidas a partir de microcepas estabelecidas em minijardim clonal na condição ex vitro. As avaliações in vitro foram realizadas quanto à percentagem de sobrevivência dos enxertos, crescimento das plantas enxertadas e o vigor aos 55 dias de idade. Na fase ex vitro, em viveiro de produção de mudas, foi implantado uma área de multiplicação vegetativa composta pelos tratamentos: microcepas provenientes de enxertia in vitro - I subcultivo (T1); microcepas provenientes de enxertia in vitro - II subcultivo (T2); microcepas provenientes de enxertia in vitro - III subcultivo (T3); microcepas provenientes de enxertia in vitro - IV subcultivo (T4); microcepas após 13 subcultivos provenientes de micropropagação (T5); minicepas advindas de enxertia ex vitro (T6) e minicepas provenientes de miniestacas (T7). Coletou-se microestacas e miniestacas para avaliação de produtividade do minijardim clonal e da velocidade de enraizamento em fase de casa de vegetação. Ao final da fase de crescimento das mudas foram avaliados os parâmetros: altura das mudas, vigor, percentagem de sobrevivência e enraizamento, diâmetro de colo, massas secas de parte aérea e raiz, qualidade das mudas pelo índice de Dickson e o volume de raiz. Com base nos resultados obtidos, as plantas enxertadas apresentaram percentuais médios de sobrevivência de 94%, mostrando que a metodologia de enxertia in vitro utilizada foi eficiente, para o clone e

nas condições experimentais em que o estudo foi conduzido. O cultivo dos enxertos in vitro não foi influenciado pelas fontes de luz. No entanto, houve influência da qualidade de luz no desenvolvimento em altura do enxerto, sendo observados melhores resultados no porta-enxerto ES1 e no subcultivo IV, aos 55 dias de idade. Para a produtividade de microestacas em minijardim clonal, foi observado ligeiro aumento na produção de brotos em relação à minicepa, bem como aumento na velocidade de enraizamento em casa de vegetação, assim como nos demais parâmetros das mudas avaliadas em fase de crescimento. Conclui-se que o tipo de porta-enxerto e a enxertia seriada tendem a melhorar o desenvolvimento do propágulo utilizado como enxerto. Para as avaliações no viveiro, a micropropagação (enxertia in vitro seriada), de modo geral teve efeito positivo na produtividade do minijardim clonal, velocidade de enraizamento das microestacas, bem como nos parâmetros das mudas avaliadas em fase de crescimento do clone C1 de *Eucalyptus saligna*.

Palavras-chave: Propagação vegetativa; Micropropagação; Microenxertia; Silvicultura clonal; Microestaquia.

ABSTRACT

NAGAOKA, RAÍSSA EIKO, M.Sc., Federal University of Viçosa, December 2023. **Applicability of in vitro grafting in the clonal reinvigoration/rejuvenation of *Eucalyptus* spp.** Advisor: Aloisio Xavier. Co-supervisor: Wagner Campos Otoni.

The *Eucalyptus* spp. it is one of the most studied species within the in vitro cultivation technique, mainly with the objective of clonal reinvigoration/rejuvenation. However, there are still gaps in knowledge due to the specific needs of each genetic material. In this sense, this work aimed to evaluate in vitro grafting as a reinvigoration/rejuvenation technique, with the aim of partially restoring rhizogenic competence in the vegetative propagation of *Eucalyptus* spp. clones. The specific objectives were to evaluate: 1) the influence of two *Eucalyptus saligna* rootstocks (ES1 and ES2); 2) the effect of grafting on the reinvigoration/rejuvenation of an *Eucalyptus saligna* clone (C1); 3) the influence of two spectral qualities of light on the in vitro cultivation of grafts; 4) and the effect of the in vitro serial grafting technique on the production of shoots and rooting of micro-cuttings, obtained from micro-stumps established in a mini-clonal hedge in ex vitro conditions. In vitro evaluations were carried out on the percentage of graft survival, growth of the grafted plants and vigor at 55 days. In the ex vitro phase, in a micro-cuttings production nursery, a vegetative multiplication area was set up implemented consisting of the treatments: micro-stumps from in vitro grafting - I subculture (T1); micro-stumps from in vitro grafting - II subculture (T2); micro-stumps from in vitro grafting - III subculture (T3); micro-stumps from in vitro grafting - IV subculture (T4); micro-stumps after 13 subcultures from micropropagation (T5); mini-stumps from ex vitro grafting (T6) and mini-stumps from mini-cuttings (T7). Micro-cuttings and mini-cuttings were collected to assess the productivity of the mini-clonal hedge and the rooting speed in the greenhouse phase. At the end of the micro-cuttings growth phase, the following parameters were evaluated: micro-cuttings height, vigor survival and rooting percentage, neck diameter, aerial and root dry mass, micro-cuttings quality using the Dickson index and root volume. Based on the results obtained, the grafted plants had an average survival rate of 94%, showing that the in vitro grafting methodology used was efficient, for the clone and under the experimental conditions in which the study was conducted. In vitro graft cultivation was not influenced by light sources. However, there was an influence of the quality of light on the height development of the scion, with the best results being observed on the ES1 rootstock

and in subculture IV, at 55 days of age. For the productivity of micro-cuttings in a mini-clonal hedge, there was a slight increase in the production of shoots in relation to the mini-rootstock, as well as an increase in the rooting speed in the greenhouse, as well as in the other parameters of the micro-cuttings evaluated in the growth phase. It can be concluded that the type of rootstock and serial grafting tend to improve the development of the propagule used as a scion. For the nursery evaluations, micropropagation (serial in vitro grafting) generally had a positive effect on the productivity of the mini-clonal hedge, the rooting speed of the micro-cuttings, as well as on the parameters of the micro-cuttings evaluated during the growth phase of the *Eucalyptus saligna* C1 clone.

Keywords: Vegetative propagation; Micropropagation; Micrografting; Clonal forestry; Micro-cutting.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Enxertia in vitro.....	11
2.2. Enxertia in vitro em plantas lenhosas.....	12
2.3. Enxertia in vitro em <i>Eucalyptus</i>	14
2.4. Fatores que influenciam a enxertia in vitro.....	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPÍTULO 1: PORTA-ENXERTO, FONTES DE LUZ E ENXERTIA SERIADA in vitro NO REVIGORAMENTO/REJUVENESCIMENTO DE CLONES DE <i>Eucalyptus saligna</i>	20
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1. Obtenção do Enxerto.....	22
2.2. Obtenção dos porta-enxertos.....	22
2.3. Enxertia in vitro.....	23
2.4. Fontes de luz no cultivo in vitro dos enxertos.....	24
2.5. Delineamento experimental e análise de dados.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1. Efeito do porta-enxerto na enxertia in vitro.....	27
3.2. Efeito dos subcultivos na enxertia in vitro.....	28
4. CONCLUSÕES.....	29
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO 2: EFEITO DA ENXERTIA SERIADA in vitro NA PROPAGAÇÃO CLONAL POR MINIESTAQUIA DE <i>Eucalyptus</i> spp.	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. Material Vegetal e Local da Experimentação.....	34
2.2. Obtenção das minicepas e microcepas.....	35
2.3. Estabelecimento e manejo do minijardim clonal.....	37
2.4. Delineamento experimental e avaliações.....	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1. Produtividade das micro/minicepas.....	39
3.2. Velocidade de enraizamento das miniestacas/microestacas.....	41

3.2. Sobrevivência e crescimento das mudas de microestacas e miniestacas	44
4. CONCLUSÕES.....	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, no setor de florestas plantadas, o gênero *Eucalyptus* é responsável por 76%, desempenhando relevante papel na economia do país (IBÁ, 2023). Ainda, em 2020, a área total de plantios de eucalipto correspondia a 7,41 milhões de hectares e, em 2021, passou a ser 7,53 milhões de hectares (IBÁ, 2022).

Devido à essa expansão do setor florestal, torna-se necessário o aumento da demanda de mudas de eucalipto, sendo essencial a busca por técnicas que promovam maior produtividade e qualidade na produção de mudas no viveiro. Na silvicultura clonal, como já se sabe, são inúmeras suas vantagens (PARK et al., 2016).

No entanto, os genótipos são selecionados na idade adulta e uma das principais consequências no resgate destas árvores é a mudança de fase juvenil à adulta, que se refere à perda do seu potencial de regeneração, afetando negativamente sua capacidade de enraizamento adventício (BELLINI et al., 2014, AUMOND et al., 2017).

Neste sentido, a propagação vegetativa de plantas lenhosas em idade adulta é adversamente afetada por características que acompanham a maturação, como as taxas de crescimento e de enraizamento reduzidas (PIERIK, 1990). Todavia, isso pode ser contornado mediante a seleção de propágulos mais juvenis ou pelo uso de técnicas que promovam o rejuvenescimento do material vegetal (BONGA e DURZAN, 1987). Entre as técnicas possíveis, destaca-se a enxertia seriada in vitro em porta enxerto juvenil, com possibilidades de restauração do revigoramento/rejuvenescimento do propágulo, aumentando o potencial de enraizamento (WENDLING et al., 2014).

A enxertia in vitro promoveu o rejuvenescimento de diferentes espécies lenhosas, como *Hevea brasiliensis* Müll. (MUZIK e CRUZADO, 1958), *Sequoia sempervirens* D. Don (HUANG, et al., 1992b), *Olea europaea* L. (VIDOY-MERCADO, et al., 2012), *Prunus dulcis* Mill. (YILDIRM, et al., 2010), *Citrus* spp (HUANG, 1992a) e *Cedrela odorata* L. (ROBERT, et al., 2020).

Nesta perspectiva, o rejuvenescimento/revigoramento, pode contornar um dos fatores limitantes no sucesso da miniestaquia que é a capacidade de enraizamento do propágulo. No entanto, este é um processo complexo que pode ser influenciado por diversos fatores, entre eles: regulador de crescimento, nutrição

mineral, constituição genética, fatores ambientais e idade da planta doadora dos propágulos (DA COSTA, et al., 2013). Fatores estes que são relevantes na formação de um minijardim clonal constituído para atender à produção de mudas clonais pela propagação vegetativa por miniestaquia, no qual este último pode ser contornado com o uso da enxertia in vitro.

A implantação de um minijardim clonal, com plantas com maior grau juvenilidade obtida através do revigoração/rejuvenescimento vegetativo, pode aumentar o potencial de produção de brotos, bem como melhorar o potencial de enraizamento dos propágulos e da qualidade das mudas produzidas.

Visando avaliar a aplicabilidade da enxertia in vitro no intuito de revigoração/rejuvenescimento clonal, o objetivo deste trabalho buscou testar a enxertia in vitro de forma seriada de um clone de *Eucalyptus saligna* em dois porta-enxertos de *Eucalyptus* sp., em duas diferentes fontes de iluminação. Numa segunda etapa, visou avaliar o efeito da enxertia in vitro seriada do clone na capacidade rizogênica de microesacas produzidas em minijardim clonal na condição ex vitro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Enxertia in vitro

A enxertia in vitro foi inicialmente descrita por Murashige et al. (1972), buscando a obtenção de plantas cítricas livres de vírus, posteriormente aperfeiçoada por Navarro et al. (1975).

Navarro et al. (1975) descreveram a técnica da enxertia in vitro, como: uso de sementes, previamente desinfestadas, e germinadas in vitro, para a formação de porta-enxertos. Segundo estes autores, o procedimento da enxertia in vitro consiste em: 1) decapitar a plântula, no ponto abaixo das folhas cotiledonares, deixando-se o hipocótilo de 1 a 1,5 cm de comprimento; 2) preparo do enxerto do material desejado, isolando-se o ápice caulinar, com 3 primórdios foliares, e; 3) realização dos cortes para unir as duas partes.

Além disso, Xavier et al. (2021) descreveram a enxertia in vitro como a técnica que consiste em unir partes de uma planta a outra que servirá de suporte e comunicação com o sistema radicular, em que a utilização de porta-enxerto juvenil

(origem seminífera) pode promover o rejuvenescimento no material adulto usado como enxerto, permitindo maior êxito da enxertia.

Outro aspecto positivo do uso de porta-enxerto via semente é a produção simples e custo reduzido; atrelado a isso, muitas sementes não retém vírus que ocorrem frequentemente em plantas-matriz (HARTMMAN et al., 2017). Em contrapartida, a variabilidade genética pode conduzir a diferentes respostas quanto ao crescimento e desenvolvimento das plantas enxertadas (BANDEIRA et al., 2006).

Segundo Hartmann et al. (2017), a enxertia in vitro usa procedimentos semelhantes à enxertia convencional, mas tem usos exclusivos, tais como: cultivo de plantas livres de doenças e plantas micropropagadas que são de difícil enraizamento. A enxertia in vitro, também pode ser usada como meio de obter clones isentos de vírus e doenças, detectar incompatibilidade precocemente dos enxertos (CHILUKAMARRI et al., 2021), para superar a recalcitrância do enraizamento adventício (YILDIRIM et al., 2010). Além disso, a enxertia in vitro não depende da sazonalidade, estágio fisiológico específico (ASHRAFZADEH, 2020) como a enxertia ex vitro, além da necessidade de um menor espaço físico (IŞIKALAN et al. 2011).

Para o sucesso da enxertia in vitro é necessário considerar os seguintes fatores: condições de incubação do porta-enxerto, idade do porta-enxerto, tamanho do enxerto (BANDEIRA et al., 2006) e habilidade manual do enxertador (WANG et al., 2022), além da compatibilidade que ocorre entre os tecidos das partes dos materiais enxertados (BAO et al., 2020), o floema. Segundo Turgeon e Wolf (2009), o floema é responsável pelo transporte de nutrientes, compostos de resistência e compostos secundários (por exemplo, mRNAs, pequenos RNAs, proteínas, pequenos peptídeos e hormônios). Além disso, estudos mostram que alguns desses sinais informativos são transportados pelo floema do porta-enxerto para o enxerto e vice-versa (HAO et al., 2020; XIA et al., 2018).

2.2. Enxertia in vitro em plantas lenhosas

As espécies arbóreas possuem um período juvenil que pode variar de um a 20 anos, porém em algumas espécies florestais, essa fase pode ser mais longa, visto que geralmente para a propagação vegetativa de árvores, é mais fácil durante essa fase, quando comparada a materiais em fase adulta (VIDOY-MERCADO et al., 2021).

Em razão disso, recomenda-se priorizar a utilização de material juvenil na propagação vegetativa, seja pelo resgate de material de partes juvenis da planta, seja pela promoção do rejuvenescimento de partes da planta adulta (XAVIER et al., 2021). Segundo os mesmos autores, o rejuvenescimento busca a reversão, que pode ser total, parcial ou progressiva, do estágio adulto para uma condição mais juvenil.

Segundo Wendling et al. (2014), a enxertia é usada geralmente com o objetivo de propagar e manter clones de espécies arbóreas em sua fase madura, assim acelerando a produção de frutos e sementes, bem como na redução da altura da copa. Ainda, esses autores, citam que a enxertia, quando realizada de forma seriada e utilizando enxertos maduros em porta-enxertos juvenis, pode ser usada como ferramenta de revigoração/rejuvenescimento, podendo aumentar o potencial de enraizamento e retardar a floração.

Dentre as variações da técnica de enxertia, pode-se destacar a enxertia in vitro, que tem sido usada em espécies lenhosas, principalmente para frutíferas, na qual, foram desenvolvidos protocolos bem-sucedidos, incluindo amendoeira, macieira, cerejeira, castanheira, cítricos, videira, amoreira, oliveira, pessegueiro, pereira, pistachio e noqueira (HUSSAIN et al. 2014).

Em estudo para aperfeiçoar a técnica da enxertia in vitro para Araucária, Anselmini e Zanette (2008), concluíram que o uso de enxertia em garfagem de topo sem fenda, foi a mais eficiente, obtendo as maiores porcentagens de sobrevivência (valores entre 86,7 a 100%). Foram testados dois locais de enxertia no porta-enxerto: caule e hipocótilo, e dois tipos de enxertia: garfagem de topo com e sem fenda. O crescimento dos microenxertos indicou o restabelecimento das conexões vasculares.

Revilla et al. (1996), ao estudarem a enxertia in vitro em *Olea europaea* L., coletaram brotos terminais de plantas cultivadas em casa de vegetação, com idade de 12 anos e realizaram introdução in vitro. Já no primeiro e segundo subcultivos, os autores encontraram efeito de rejuvenescimento, ocorrendo a restauração da emissão de brotações, bem como a competência do enraizamento adventício. Ao comparar enraizamento de brotações das plantas adultas, juvenis e enxertadas (2%, 100% e 100% respectivamente) observaram resultados semelhantes das brotações de plantas juvenis com as enxertadas.

Na citricultura, a enxertia in vitro tem sido utilizada com sucesso na eliminação de vírus (SINGH et al., 2019); sendo possível a produção de frutos com alta qualidade fitossanitária (ABREU et al., 2003).

Em trabalho com *Cedrela odorata* L, Robert et al. (2020) objetivando utilizar a enxertia e enxertia in vitro seriada como ferramenta para restabelecer a juvenilidade, na propagação de árvores elites selecionadas, utilizaram como enxerto plantas com idade mínima de 30 anos e porta-enxerto juvenil. Ao analisarem a aparência da parte aérea, comprimento do entrenó, altura da planta, comprimento da folha e número de folhas, obtiveram valores estatisticamente iguais quando comparados ao tratamento controle (plantas juvenis derivadas de sementes), e estatisticamente diferentes no tratamento dos propágulos adultos que não foram enxertados.

Danthu et al. (2002) realizaram a enxertia in vitro em *Faidherbia albida*, de forma seriada e obtiveram resultados significativos no terceiro ciclo, com crescimento do enxerto e competência de enraizamento das microestacas retiradas dos enxertos. Este quando comparado com o tratamento controle (planta doadora de propágulos de origem juvenil), foi estatisticamente igual (75% e 85% de enraizamento, respectivamente). Concluindo que a técnica é válida para o restabelecimento da competência de enraizamento na espécie estudada.

Por outro lado, Rangel et al. (2011) ao estudar a enxertia seriada in vitro em *Annona muricata* L., apesar do desenvolvimento dos brotos observado nas plantas que passaram pela enxertia seriada, ao avaliar rizogênese dos propágulos provenientes de plantas enxertadas e não enxertadas, ambas não desenvolveram sistema radicular in vitro.

2.3. Enxertia in vitro em *Eucalyptus*

Bandeira et al. (2006) em estudo de enxertia in vitro em clones de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, não observaram diferença no pegamento entre as diferentes espécies de porta-enxerto. No entanto, em relação ao crescimento em altura, foram observados melhores resultados no porta-enxerto de *E. urophylla*. Os autores observaram o pegamento de até 93% das plantas enxertadas, aos 50 dias de idade.

Cooman et. al. (1996), estudando o papel dos fenóis endógenos na determinação da incompatibilidade de enxertia in vitro em *Eucalyptus gunnii*,

observaram que a enxertia de materiais compatíveis, as flutuações fenólicas na área do enxerto foram bem diferentes daquelas em enxertos incompatíveis.

Para espécies arbóreas as pesquisas em enxertia in vitro tem se mostrado promissoras, entretanto, para o gênero *Eucalyptus*, ainda existe carência de estudos que avaliem a enxertia in vitro como ferramenta para revigoramento/rejuvenescimento de propágulos em fase adulta.

2.4. Fatores que influenciam a enxertia in vitro

Segundo Franzon et. al. (2010) existem fatores que influenciam o sucesso da enxertia na propagação de plantas, tais como: afinidade botânica, a incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, as condições ambientais e os fatores fisiológicos. Ainda, alguns fatores como tipo de enxertia, tamanho do enxerto, cultivar, idade do porta-enxerto, contaminações endógenas, habilidade manual do enxertador, podem influenciar no sucesso da enxertia in vitro (SANABAM et al, 2015; WANG et al., 2022).

Cooman et al. (1996), na enxertia in vitro em *E. gunnii*, 20 dias após enxertia, verificaram que a região de união do enxerto apresentava sintomas de incompatibilidade, onde os tecidos tornaram-se progressivamente marrons. Estudos histológicos revelaram espessamento das paredes celulares. Já aos 40 dias após a enxertia, os sintomas de incompatibilidade eram macroscopicamente visíveis na área enxertada, sendo observado escurecimento generalizado dos tecidos posteriormente necrose progressiva das células do enxerto.

Acompanhado por Bandeira (2004), em enxertia in vitro em *Eucalyptus urophilla* x *E. grandis*, observou variabilidade de resposta ao testar diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto. Segundo a autora, é explicada pela qualidade dos enxertos obtidos, assim como pelas interações genótípicas, anatômicas e fisiológicas estabelecidas entre as diferentes partes enxertadas. Dentre os fatores limitantes observados na obtenção de resultados satisfatórios, a destreza e habilidade manual durante a execução das enxertias são relevantes, sendo necessário, quando se tratando de enxertia in vitro, treinamento e mão-de-obra tecnicamente qualificados.

Segundo Hartmann et al. (2017), uma planta pode ter reversão ou interrupção de seu envelhecimento ontogenético, colocando-a em condição na ausência de luz, podendo ser uma técnica para melhorar a eficiência de enraizamento. Ainda, de

acordo com Xavier et al. (2021), as condições ambientais de incubação do enxerto devem ser observadas, pois uma fase inicial (7 a 15 dias) na ausência de luz pode ser vantajosa no pegamento do enxerto.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. F.; NUNES, J. C. O.; SANTOS, M.; PEDROTTI, E. L. Estudo histológico preliminares da microenxertia de plantas micropropagadas de macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, p. 195-196, 2003.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4 p. 967 – 973, 2008

ASHRAFZADEH, S. In vitro grafting – twenty-first century’s technique for fruit tree propagation. **Acta Agriculturae Scandinavica, Seção B — Soil & Plant Science**. v. 70, n 5, p. 404-405, 2020.

AUMOND, M. L.; Jr.; ARAUJO, A. T., Jr. de OLIVEIRA- JUNKES, C. F.; de ALMEIDA, M. R.; MATSUURA, H. N.; de COSTA, F.; FETT-NETO, A. G. Events associated with early age-related decline in adventitious rooting competence of *Eucalyptus globulus* Labill. **Frontiers in Plant Science**. v. 8, p. 1734, 2017.

BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; DIAS, J. M. M. Enxertia in vitro na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 223-232, mar. 2006.

BAO, W. W.; ZHANG, X. C.; ZHANG, A. L.; ZHAO, L.; WANG, Q. C.; LIU, Z. D. Validation of micrografting to analyze compatibility, shoot growth, and root formation in micrografts of kiwifruit (*Actinidia* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 140, p. 209-214, 2020.

BELLINI, C., PACURAR, D. I., PERRONE, I. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences Anual. **Review of Plant Biology**. v. 65, p.639–666. 2014

BONGA J.M.; DURZAN, D. J. **Cell Tissue Culture in Forestry: General Principles and Biotechnology**. v. 1. p. 249–271. 1987. Disponível em: <<https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-017-0994-1>>. Acesso em 15 nov. 2023.

CHILUKAMARRI, L.; ASHRAFZADEH, S.; DAVID, W. M. Leung, In-vitro grafting – Current applications and future prospects, **Scientia Horticulturae**, v. 280, 2021, 109899, ISSN 0304-4238,

COOMAN, L.; EVERAERT, E.; CURIR, P.; DOLCI, M. The possible Role of phenolics in incompatibility expression in *Eucalyptus gunnii* micrografts. **Phytochemical Analysis**. v. 7, p. 92-96, 1996.

DA COSTA, C., De ALMEIDA, M., RUEDELL, C., SCHWAMBACH, J., MARASCHIN, F., FETT-NETO, A. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in Plant Science**. v. 4: p. 133., 2013

DANTHU, P.; HANE B.; SAGNA, P.; GASSAMA, Y. K. Restoration of rooting competence in mature *Faidherbia albida*, a Sahelian leguminous tree, through serial root sucker micrografting. **New Forests** v. 24: p. 239–244 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A%3A1021396814374>. Acesso em: 10 fev. 2022.

FRANZON, R. C., CARPENEDO; S. SILVA, J. C. S. **Produção de mudas: principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras. Planaltina**, DF Embrapa Cerrados, n.56, 55p. 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77778/1/doc-283.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2021.

HAO, L.; ZHANG, S. W.; ZHANG, W.; WANG, S.; XU, C.; YU, Y.; LI, T.; JIANG, F.; LI, W. A constitutive and drought-responsive mRNA undergoes long-distance transport in pear (*Pyrus betulaefolia*) phloem, **Plant Science**, v. 293, 2020.

HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES JUNIOR, F. T., GENEVE, R. L. **Plant propagation; principles and practices**. 9 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2017. 1024 p.

HUANG, L. C.; HSIAO, C. K.; LEE, S. H.; HUANG, B. L.; MURASHIGE, T. Restoration of vigor and rooting competence in stem tissues of mature citrus by repeated grafting of their shoot apices onto freshly germinated seedlings in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. 28, 30–32. 1992a.

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. 1992b

HUSSAIN, G.; WANI, M.S.; MIR, M.A.; RATHER, Z.A.; BHAT, K.M. Micrografting for fruit crop improvement. **African Journal of Biotechnology**. v.13, p.2474-2483, 2014.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. **Relatório anual 2022**. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf>. Acesso em: 04 mai. 2023.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. **Relatório anual 2023**. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2023-r.pdf> Acesso em: 01 dez. 2023.

IŞIKALAN, Ç.; NAMLI, S.; AKBAS, F.; EROL, B. Micrografting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar ‘Nonpareil’. **Australian Journal of Crop Science AJCS**, v. 5, n 1, p. 61-65, 2011.

MOORE, R. (1991) Graft Compatibilities in vitro. In: BAJAJ YPS (eds) High-Tech and Micropropagation I. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v 17. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8_5

MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RAGAN, 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.

MUZIK, T., CRUZADO, H. Transmission of Juvenile Rooting Ability from Seedlings to Adults of *Hevea brasiliensis*. **Nature**. v. 181, p. 1288, 1958. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1811288a0.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2023.

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, p. 471-479, 1975.

PARK, Y.S., BONGA, J. M., MOON, H. K. Vegetative propagation of forest trees, **National Institute of Forest Science**. 2016 Disponível em: <http://www.iufro.org/science/divisions/division-2/20000/20900/20902/publications/>. Acesso em: 20 nov 2023.

PIERIK, R. L. M. Rejuvenation and Micropropagation. In: NIJKAMP, H.J.J., VAN DER PLAS, L.H.W., VAN AARTRIJK, J. (eds) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Current **Plant Science and Biotechnology in Agriculture**, v. 9., 1999. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-2103-0_13 Acesso em 02 nov. 2022.

PRAKASH, O.; SHOOD, A.; SHARMA, M.; AHUJA, P. S. Grafting micropropagated tea *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] shoots on tea seedlings – a new approach to tea propagation. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 10, p. 883-888, 1999.

RANGEL, A. M. A.; SALAMANCA, E. J. P.; RESTREPO, D. C. Evaluación de medios de cultivo para la producción in vitro de *Annona muricata* mediante la técnica de microinjertación seriada. **Acta Agronómica**. v. 60, n. 2, 2011. Disponível em: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/27836/28087. Acesso em: 10 out. 2023

REVILLA, M., PACHECO, J., CASARES, A., RODRIGUEZ, R. In vitro reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 32, 257–261, 1996

ROBERT, M. L.; JUÁREZ-GÓMEZ, J.; CHAIRES-PACHECO, M.; PEÑA-RAMÍREZ, Y. J. Successive grafting confers juvenility traits to adult Spanish red cedar (*Cedrela odorata* Linnaeus): a tool for the rescue of selected materials. **New Forest**. v. 51, p. 335–347, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-019-09736-7>

SANABAM, R.; SINGH, N. S.; HANDIQUE, P. J.; DEVI, H. S. Disease-free khasi mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) production using in vitro microshoot tip grafting and

its assessment using DAS-ELISA and RT-PCR. **Scientia Horticulturae**, v. 189, p. 208-213, 2015.

SHIDHAR, D.; VENUGOPAL, S. Improvement of Fruit Crops through Micrografting. **Advances in Agriculture Sciences**. p. 88-103, 2019.

SINGH, A. K.; MEETEI, N. T.; KUNDU, S.; SALMA, U.; MANDAL, N. In vitro micrografting using three diverse indigenous rootstocks for the production of Citrus trsriteza virus-free plants of Khasi mandarin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v 55, n 2, p 180-189, 2019.

TURGEON R, WOLF S. Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. **Annual Review of Plant Biology**. v. 60, p. 207, 2009. DOI: 10.1146/annurev.arplant.043008.092045

VIDOY-MERCADO, I.; NARVÁEZ, I.; PALOMO-RÍOS, E.; LITZ, R.E.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Reinvigoration/Rejuvenation Induced through Micrografting of Tree Species: Signaling through Graft Union. **Plants**, v. 10, 6^a ed., p. 119, 2021.

VIDOY-MERCADO, I.; IMBRODA-SOLANO, I.; VIRUEL, M.A.; PLIEGO-ALFARO, F.; BARCELÓ-MUÑOZ, A. The influence of in vitro micrografting on vegetative propagation of the Olive cultivar 'Arbequina'. **Acta Horticulturae**, v. 949, p. 31–34, 2012.

WENDLING, I. TRUEEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v.1, p.1-14, 2014.

XAVIER, A.; WEDLING I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. 3.ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2021. 275 p.

XIA, C.; ZHENG, Y.; HUANG, J.; ZHOU, X.; LI, R.; ZHA, M.; WANG, S.; HUANG, Z.; LAN, H.; TURGEON, R.; FEI, T.; ZHANG, C. Elucidation of the Mechanisms of Long-Distance mRNA Movement in a *Nicotiana benthamiana*/Tomato Heterograft System, **Plant Physiology**, v 177, ed. 2, p. 745–758, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01836>

YILDIRIM H, Onay A, Suzerer V, Tilkat E, Ozden-Tokatli Y, Akdemir H. Microenxertia de amêndoa (*Prunus dulcis* Mill.) cultivares “Ferragnes” e “Ferraduel”. **Ciência Hortic**, v. 125, p. 361–367, 2010.

CAPÍTULO 1: PORTA-ENXERTO, FONTES DE LUZ E ENXERTIA SERIADA in vitro NO REVIGORAMENTO/REJUVENESCIMENTO DE CLONES DE *Eucalyptus saligna*

RESUMO: O gênero *Eucalyptus* é amplamente propagado pela miniestaquia, sendo o sucesso deste método imprescindível à boa qualidade do enraizamento adventício, refletindo diretamente na qualidade da muda produzida. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo avaliar: 1) a influência de dois porta-enxertos de *Eucalyptus* spp. na propagação pela enxertia in vitro de um clone de *Eucalyptus saligna*; 2) o efeito da enxertia in vitro de forma seriada, e, 3) a influência de duas fontes de luz no cultivo in vitro dos enxertos. Os porta-enxertos foram provenientes de duas fontes (ES1 e ES2) de sementes de *E. saligna* germinadas in vitro e o enxerto, por um clone de *E. saligna* (C1). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições. As parcelas foram constituídas por duas fontes de luz L1 (FB: luz fluorescente branca) e L2 (LVA: luz LED Vermelha/Azul + FB); as subparcelas corresponderam a dois tipos de porta-enxertos (ES1 e ES2) e as subsubparcelas, constituídas pelos cinco subcultivos (I, II, III, IV e V). As avaliações foram realizadas quanto à percentagem de pegamento dos enxertos, crescimento em altura das plantas enxertadas e vigor aos 55 dias. As plantas enxertadas apresentaram percentuais médios de pegamento de 94% aos 55 dias de idade, indicando que a metodologia de enxertia in vitro utilizada foi eficiente para o clone e nas condições deste experimento. Para o crescimento dos enxertos foram observadas diferenças significativas das plantas enxertadas, indicando que o porta-enxerto influencia no desenvolvimento do enxerto (ES1), bem como um melhor desenvolvimento dos brotos a cada novo subcultivo da enxertia seriada.

Palavras chave: Propagação in vitro; micropropagação; microenxertia.

1. INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa de genótipos superiores constitui em uma alternativa para aumentar a produtividade e melhorar a qualidade de plantios florestais. No entanto, o enraizamento adventício pode ser um desafio para o gênero *Eucalyptus*, principalmente quando se trata de material adulto (Souza et al, 2019).

A micropropagação para o *Eucalyptus* tem sido recomendada para o revigoração/rejuvenescimento de clones superiores, de alto valor comercial, resgatados de material adulto de difícil enraizamento, visando à microestaquia (DUTRA et al., 2009, WENDLING 2021; XAVIER et al., 2021). Entre as técnicas utilizadas para essa finalidade, pode-se citar a enxertia in vitro. Wendling et al. (2014) citam que o uso da enxertia, na forma seriada, utilizando enxertos maduros em porta-enxertos juvenis, pode ser considerada ferramenta de revigoração/rejuvenescimento, podendo aumentar o potencial de enraizamento dos propágulos.

Neste sentido, Vidoy-Mercado et al. (2021) observaram que brotos obtidos após passarem por enxertia seriadas in vitro, aumentam a competência de enraizamento adventício e desenvolvem características juvenis e, em alguns casos, os brotos apresentam proliferação in vitro aumentada. HAO et al. (2020), observaram que entre o floema do porta-enxerto e do enxerto são transportadas macromoléculas móveis (por exemplo o mRNA), podendo atuar na regulação do crescimento da planta.

A enxertia in vitro, também pode ser usada como meio de obter clones isentos de vírus e doenças, bem como detectar incompatibilidades de enxertos em um estágio inicial (Prakash et al., 1999).

Ainda, o cultivo in vitro permite controlar os fatores ambientais, como a luz. As plantas tem seu desenvolvimento e crescimento regulados pela luz, onde suas características morfológicas são alteradas em resposta a sinais luminosos a depender da intensidade e qualidade (YADAV et al., 2020, Taiz e ZEIGER, 2004).

Diante do exposto, buscou-se avaliar a aplicabilidade da enxertia seriada in vitro em um clone de *E. saligna*. Como objetivos específicos avaliou-se: 1) a influência de dois tipos de porta-enxertos; 2) a influência da qualidade da luz no desenvolvimento das brotações após a enxertia; e, 3) o efeito da enxertia in vitro de forma seriada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa - UFV, localizado no município de Viçosa – MG, no período de abril de 2021 a novembro de 2023.

2.1. Obtenção do Enxerto

Para o presente estudo foi utilizado como material vegetal o clone (C1) de *Eucalyptus saligna*, estabelecido em banco clonal in vitro, por meio da micropropagação via gemas axilares. As plantas foram subcultivadas em tubos de ensaio (vedados com tampa Bellco® culture tube closures, 25 mm) contendo 10 mL do meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) ou WPM (LLOYD & McCOWN, 1981), adicionado 0,3 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,01 mg L⁻¹ de ácido α -naftalenoacético (ANA), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (Synth®), 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar (Phytotechnology). O pH do meio foi ajustado para 5,7 \pm 0,1 e autoclavado a 120 °C, pressão de 1,0 Kgf cm⁻² durante 20 minutos.

A cada 20-30 dias, realizou-se o subcultivo dos explantes para novo meio de cultura. Os dois meios foram usados de forma alternada (por exemplo, iniciou-se com o meio JADS, no subcultivo seguinte usou-se WPM e assim por diante), isolando-se tufo de brotações, padronizados com duas a três brotações maiores do que 10 mm e com adequado vigor vegetativo, para obtenção de gemas alongadas para os enxertos. Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de cultura a 25 \pm 2 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 50 μ mol m⁻² s⁻¹, fornecidas por dois tubos fluorescentes branco-frios (Lâmpada Fluorescente HO 110W/54 6200K T12 PHILIPS). Para obtenção de gemas alongadas no padrão necessário para a enxertia, os explantes se encontravam no 8º subcultivo.

2.2. Obtenção dos porta-enxertos

Utilizou-se para a realização deste trabalho, porta-enxertos produzidos a partir de sementes provenientes de “Pomares de Sementes de Autofecundação” (ES1) de *E. saligna*, e de “Área de Produção de Sementes” (ES2) fornecidas pela empresa CMPC - Celulose Riograndense, localizado no município de Guaíba – RS.

Para a obtenção de porta-enxertos, as sementes foram previamente imersas por um minuto em álcool etílico 70% (v/v), para quebra de tensão superficial, seguido da imersão em uma solução de hipoclorito de sódio 5% (v/v), acrescido de uma gota de Tween 20 para cada 100 mL de solução, permanecendo imerso sob agitação

constante por 15 minutos. Ao final do processo as sementes foram enxaguadas por cinco vezes em água destilada autoclavada.

As sementes foram germinadas in vitro, a partir da inoculação em tubos de ensaio (vedados com tampa Bellco® culture tube closures, 25 mm) contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com metade da força iônica, acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mioinositol, 400 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), e 5,5 g L⁻¹ de ágar (Phytotechnology). As culturas foram mantidas por sete dias na ausência de luz e posteriormente transferidas para sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 50 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro, LI-COR®, LI-250A Light Meter) e temperatura de 25 ± 2 °C.

2.3. Enxertia in vitro

A execução da enxertia in vitro foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos II – BIOAGRO/UFV, Viçosa/MG.

A partir de um banco clonal in vitro já estabelecido, micropropagado pela proliferação de gemas axilares, obteve-se ápices caulinares (enxertos), com aproximadamente 1,5 cm de comprimento e dois a três pares de folhas totalmente expandidas. Esta técnica foi realizada com o auxílio de lupa binocular (Lupa Microscópio Estereoscópio 40x DI-724, Digilab®), em que as gemas alongadas in vitro (Figura 1 A) foram retiradas dos tubos de ensaio e colocadas sobre papel de filtro (estéril) e umedecido com água estéril e, em seguida, realizado o corte em duplo bisel na porção basal do ápice caulinar.

Os porta-enxertos (Figura 1 B) foram selecionados, após 30 a 45 dias da germinação, apresentando sistema radicular bem desenvolvido e completo, com altura mínima do coleto, em relação ao primeiro par de folhas cotiledonares, com no mínimo 1,5 cm e desenvolvimento da parte aérea normal (ápice normal, sem deformidades). Assim, a parte aérea foi decapitada abaixo da primeira folha cotiledonar, a fim de evitar brotações indesejadas.

Após o devido preparo do porta-enxerto e do enxerto (Figura 1 C), em condições assépticas, sob lupa binocular e com o auxílio de pinças, procedeu-se à união de ambas as partes (Figura 1 D). Em seguida, as plantas enxertadas foram

inoculadas em tubos de ensaio (vedados com tampa Bellico® culture tube closures, 25 mm) (Figura 1 D) contendo 10 mL do meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de BAP; 0,1 mg L⁻¹ de ANA, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (Synth®), 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar (Phytotechnology). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado a 120 °C, pressão de 1,0 Kgf cm⁻² durante 20 minutos.



Figura 1 - Etapas da enxertia in vitro em clone de *E. saligna*. **(A)** gema alongada do clone C1 (Barra = 10 mm); **(B)** porta-enxerto juvenil de *E. saligna* (Barra = 10 mm); **(C)** enxerto e porta-enxertos confeccionados e antes da união (Barra = 10 mm); **(D)** planta após enxertia e inoculação em meio de cultura contendo carvão ativado (Barra = 10 mm); a seta vermelha indica local da união das plantas; **(E)** desenvolvimento em altura do enxerto após 55 dias após enxertia (Barra = 10 mm) e o círculo vermelho indicando a parte utilizada para confecção do enxerto do II subcultivo; **(F)** enxerto do II subcultivo após introdução em tubo de ensaio (Barra = 10 mm).

2.4. Fontes de luz no cultivo in vitro dos enxertos

Após a enxertia, as plantas enxertadas em ES1 e ES2, permaneceram por 55 dias em sala de crescimento com os seguintes tratamentos de luz:

L1: 55 dias sob Luz fluorescente branca (FB) fornecida por dois tubos fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil);

L2: Sete dias sob Luz LED Vermelha/Azul (LVA), divididas proporcionalmente em 50:50, e, em seguida transferidas para a LED Vermelha/Azul, fornecida por dois canais de lâmpadas (LA, 1:99) por mais sete dias. Por fim, foram transferidas para luz branca fluorescente (FB) até completarem 55 dias. A luz LED Vermelha/Azul foi

fornecida por dois canais de lâmpadas (LabPARLL-HR / DB480, 11,6 W, LabLumens®, Carapicuíba, SP, Brasil).

O fotoperíodo foi de 16 horas, na qual ambas as fontes de luzes foram padronizadas em $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro, LI-COR®, LI-250A Light Meter) e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.5. Delineamento experimental e análise de dados

Para este estudo, o experimento de enxertia in vitro foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com esquema de parcelas subsubdivididas, contendo quatro repetições. As parcelas foram constituídas pelos tratamentos de fontes de luz (L1 e L2), as subparcelas corresponderam a dois tipos de porta-enxertos (ES1 e ES2) e as subsubparcelas, constituídas pelos cinco subcultivos (I, II, III, IV e V). Cada unidade experimental foi constituída por 5 plantas.

Os parâmetros avaliados foram quanto à percentagem de sobrevivência, tamanho (a partir do local enxertado até o ápice da brotação principal) e vigor dos brotos avaliado com base, em uma escala de notas de 1 a 3, onde 1: Ruim, 2: Médio e 3: Ótimo (Figura 2).



Figura 2 - Características observadas para a avaliação de vigor dos enxertos aos 55 dias após enxertia: 1: ruim; 2: médio; 3: ótimo. (Barra = 1 cm), para o clone C1 (*E. saligna*).

Ao completarem 55 dias, a partir dos enxertos, foi realizada nova enxertia utilizando brotações com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, seguindo a mesma metodologia já descrita para enxertia in vitro. Compondo assim os subcultivos da enxertia seriada. Para isto, foram selecionadas plantas enxertadas (I subcultivo) com brotações superiores a 1,5 cm de comprimento e dois a três pares de folhas

totalmente expandidas. Em um novo porta-enxerto, preparado para confecção de enxertos para compor o tratamento do II subcultivo, realizou-se o mesmo procedimento mencionado no item 2.3. Este procedimento foi realizado até a obtenção dos cinco subcultivos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste Duncan em nível de 5% de significância. A análise dos dados foi realizada no software estatístico R versão 3.5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enxertia *in vitro* têm aplicabilidade na limpeza clonal e no revigoramento/rejuvenescimento de material vegetal quando utilizado porta-enxerto de material juvenil. O rejuvenescimento tem como objetivo a reversão do estágio adulto para uma condição mais juvenil, melhorando o vigor da planta enxertada. Neste sentido, no presente trabalho foram observadas diferenças significativas em relação à altura dos enxertos avaliados, para os dois porta-enxertos e para os subcultivos.

Com base nos resultados obtidos para a avaliação de sobrevivência dos enxertos avaliados após 55 dias de sua execução, a média obtida foi de 94% com valores variando de 79 a 100%, o qual pode ser considerada uma ótima resposta visto ao vigor das plantas (Tabela 1).

Tabela 1 - Sobrevivência e vigor da enxertia *in vitro*, avaliados por porta-enxerto (ES1 e ES2), fontes de luz (L1 e L2) e enxertia seriada (I, II, III, IV e V), avaliados aos 55 dias de idade após execução da enxertia para o clone C1 de *E. saligna*.

Porta-enxerto	Fonte de Luz	Enxertia Seriada (Subcultivos)				
		I	II	III	IV	V
		Sobrevivência dos Enxertos (%)				
ES1	L1	79	94	87	100	92
	L2	89	100	100	100	100
ES2	L1	89	94	88	100	100
	L2	83	93	88	100	100
Vigor (1-3)						
ES1	L1	1,9	2,4	2,5	2,8	2,9
	L2	1,9	2,7	2,6	2,5	2,9
ES2	L1	1,9	2,2	2,5	2,3	2,3
	L2	2,0	1,9	2,5	2,2	2,5

Foram observadas diferenças significativas para a altura das plantas, mediante a análise separada do tipo de porta-enxerto e os subcultivos (Figura 2). Para os parâmetros de vigor e pegamento não foi observada diferença entre os tratamentos avaliados.

3.1. Efeito do porta-enxerto na enxertia in vitro

Em relação aos porta-enxertos (ES1 e ES2) foi observado que o ES1 (22,08 mm) apresentou valores médios de altura das plantas enxertadas, significativamente diferentes (Figura 2), quando comparado ao ES2 (18,60 mm).

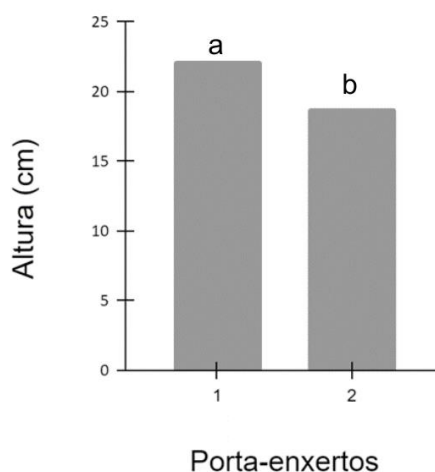


Figura 2 - Médias de crescimento em altura das plantas enxertadas em dois porta-enxertos juvenis de *E. saligna* (ES1 e ES2), avaliados aos 55 dias após a realização da enxertia in vitro. Médias seguidas pela mesma letra não diferentes pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade.

Ambos os porta-enxertos são da mesma espécie do clone utilizado como enxerto. Todavia, o porta-enxerto ES1 é progênie do enxerto (C1) utilizado, explicando, em parte, a compatibilidade entre eles, melhorando significativamente os resultados de desenvolvimento das brotações. A afinidade entre o enxerto e o porta-enxerto é um fator essencial na enxertia que compreende desde aspectos morfológicos, fisiológicos, anatômicos e bioquímicos de uma planta (YIN et al., 2012; WENDLING et al., 2017). Ainda, foi observada elevada taxa de pegamento, fato este que pode estar atrelada à afinidade entre porta-enxerto e enxerto, bem como o uso de porta-enxertos juvenis (provenientes de sementes).

Segundo Roncatto et al. (2011), a maior afinidade entre enxerto e porta-enxerto, aumenta as chances de sucesso na enxertia. Quanto mais maduros e complexos forem os tecidos ou órgãos das plantas utilizadas, mais difícil se torna o sucesso da enxertia.

Além disso, para Gaspar et al. (2017), as características juvenis associadas à qualidade do material utilizado na propagação e a técnica de aplicação podem resultar em maior taxa de sobrevivência e vigor do enxerto. Em *Araucaria angustifolia* os autores utilizaram porta-enxertos com idades igual a 8 e 35 anos, sendo que as melhores taxas de sobrevivência foram detectadas nos mais jovens (71,9%), em comparação aos porta-enxertos mais velhos (6,25%).

Em contrapartida, Bandeira et al. (2006), na enxertia in vitro de dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis* em porta-enxertos juvenis obtidos por sementes de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* e germinadas in vitro, observaram, aos 50 dias, variação de 20 a 93% de pegamento das plantas enxertadas. Os autores atribuíram o baixo rendimento ao nível de habilidade e agilidade na execução da enxertia.

Por outro lado, a variação verificada na presente pesquisa, da resposta entre enxerto e porta-enxerto pode ser atribuída às interações genéticas e fisiológicas (BANDEIRA, 2004).

3.2. Efeito dos subcultivos na enxertia in vitro

Em relação à altura, os subcultivos indicaram diferenças entre si, com uma tendência de efeito positivo a cada subcultivo (16,64; 19,93; 18,79; 24,05; 23,33 mm do I ao V subcultivos, respectivamente), avaliados aos 55 dias após enxertia (Figura 3).

O crescimento em altura das plantas enxertadas de forma seriada in vitro, nos subcultivos I e IV foi de 16,6 mm a 24,2 mm, respectivamente. Para o gênero *Eucalyptus* destaque-se que existe carência de pesquisas que abordem os possíveis efeitos da enxertia seriada, tanto in vitro quanto ex vitro.

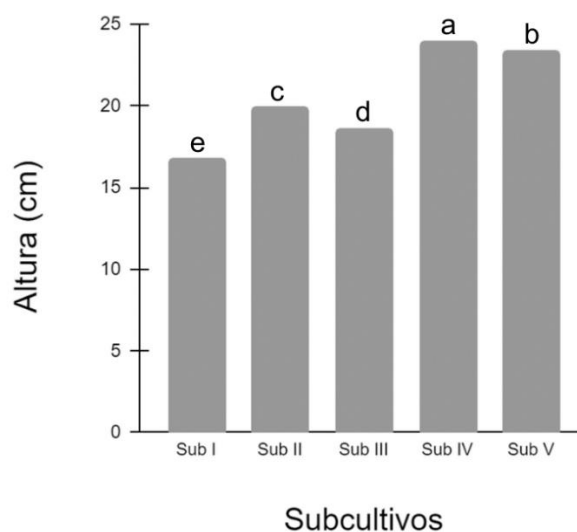


Figura 3 - Média de crescimento em altura das plantas enxertadas de forma seriada in vitro (I a V subcultivo), avaliadas aos 55 dias após a realização da enxertia in vitro, para o clone C1 (*E. saligna*). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Estudo com outras espécies, a exemplo *Ilex paraguariensis*, mostrou diferenças em relação ao comprimento médio de brotações, em três subcultivos avaliados. Os autores concluíram que os sucessivos subcultivos resultam em melhorias para os parâmetros de sobrevivência e vigor dos enxertos (SANTIN et al., 2015). Em concordância, Huang, et. al. (1992), observaram na enxertia in vitro seriada em citros (material adulto, em fase de frutificação) melhora em relação ao comprimento dos caules avaliados, conforme aumentava-se os subcultivos (1 a 7 subcultivos). As plantas apresentaram de 2,3 a 3,0 cm de comprimento (respectivamente), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a metodologia de enxertia in vitro utilizada foi eficiente para o clone C1 (*E. saligna*) e nas condições deste experimento, sendo as fontes de luz utilizadas indiferentes no cultivo. Os melhores resultados quanto ao desenvolvimento em altura foram observados para o porta-enxerto ES1 e no IV subcultivo, concluindo que o tipo de porta-enxerto tem efeito na enxertia, bem como a realização da enxertia, de forma seriada, mostraram tendência de efeito positivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRONDANI, G. E.; de WIT ONDAS, H. W.; BACCARIN, F. J. B. NATAL, A.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**. v. 48, p. 478–487, 2012.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Z. DO; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, v. 48, n. 49, p. 107-116, 1995.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, 49 p., 2010. Disponível em: <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/5>. Acesso em: 10 jun. 2022.

GATO, A. M. G., SILVA, S. FERREIRA, F. F., RODRIGUES, D. C. Efeitos de diferentes reguladores de crescimento na produção de mudas micropropagadas de *Ananas erectifolius* L.B.Sm. **Scientia Amazonia**, v. 8, n. 3, B1-B7, 2019. Disponível em: <http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2019/08/v.-8-n.-3-B1-B7-2019.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2022.

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. 3, p. 421-427, 1980.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MUZIK, T., CRUZADO, H. Transmission of Juvenile Rooting Ability from Seedlings to Adults of *Hevea brasiliensis*. **Nature**, v. 181, p. 1288, 1958. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1811288a0.pdf>. Acesso em: 01 dez 2022.

SOUZA, D. M. S. C., FERNANDES, S. B., AVELAR, M. L. M., FRADE, S. R. P., MOLINARI, L. V., GONÇALVES, D. S.; BRONDANI, G. E. Mixotrophism effect on in vitro elongation and adventitious rooting of *Eucalyptus dunnii*. **Cerne**, 2019, v. 25, p. 394-401, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed, Porto Alegre: Artmed Editora, 2004.

VIDOY-MERCADO, I.; NARVÁEZ, I.; PALOMO-RÍOS, E.; LITZ, R.E.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Reinvigoration/ Rejuvenation Induced through Micrografting of Tree Species: Signaling through Graft Union. **Plants**, v. 10, 6ª ed., p. 1197, 2021.

WENDLING, I., TRUEMAN, S. J., & XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 1, p. 473-486, 2014.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Viçosa, v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.

XAVIER, A.; WEDLING I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. 3.ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2021. 275 p.

YADAV A, SINGH D, LINGWAN M, YADUKRISHNAN P, MASAKAPALLI SK, DATTA S. Light signaling and UV-B-mediated plant growth regulation. **Journal Integrative Plant Biology**. v. 62, n. 9, p. 1270-1292, 2020

YIN, H.; YAN, B.; SUN, J.; JIA, P.; ZHANG, Z.; YAN, X.; CHAI, J.; REN, Z.; ZHENG, G.; LIU, H. Graft-union development: a delicate process that involves cell-cell communication between scion and stock for local auxin accumulation. **Journal of Experimental Botany**. Jun; v. 63, p. 4219-32, 2012.

CAPÍTULO 2: EFEITO DA ENXERTIA SERIADA *in vitro* NA PROPAGAÇÃO CLONAL POR MINIESTAQUIA DE *Eucalyptus* spp.

RESUMO: O gênero *Eucalyptus* é amplamente propagado pela miniestaquia. Para o sucesso deste método é imprescindível a formação de raízes adventícias que refletirá diretamente na qualidade da muda produzida. A enxertia seriada *in vitro*, tem sido indicada na literatura científica como técnica de rejuvenescimento vegetativo, visando contornar algumas dificuldades da micropropagação, e por consequência maximizar a propagação clonal na condição *ex vitro*, como a recalcitrância ao enraizamento adventício. Considerando o potencial uso desta técnica no revigoramento/rejuvenescimento, o objetivo deste trabalho foi avaliar microcepas obtidas a partir da técnica de enxertia *in vitro* seriada, estabelecidas em minijardim clonal na condição *ex vitro*, quanto à produção e enraizamento das microestacas. Foi implantado um minijardim clonal na condição *ex vitro* (viveiro), composto pelos tratamentos: microcepas provenientes de enxertia *in vitro* - I subcultivo (T1); microcepas provenientes de enxertia *in vitro* - II subcultivo (T2); microcepas provenientes de enxertia *in vitro* - III subcultivo (T3); microcepas provenientes de enxertia *in vitro* - IV subcultivo (T4); microcepas provenientes de micropropagação subcultivadas 13 vezes (T5); minicepas advindas de enxertia *ex vitro* (T6) e minicepas provenientes de miniestacas (T7). Os dados foram coletados ao longo das quatro estações do ano quanto à produtividade em microestacas/microcepas e miniestacas/cepas, bem como foram realizadas avaliações quanto à velocidade e percentagem de enraizamento das microestacas e miniestacas. Após 30 dias em pátio de crescimento a pleno sol, foram realizadas avaliações da sobrevivência, enraizamento, vigor, altura, diâmetro de colo, massa seca da parte radicular e da parte aérea da muda produzida, bem como determinou-se o volume de raiz e o índice de qualidade de Dickson. Os resultados obtidos indicaram que as microestacas foram significativamente superiores às miniestacas em relação à velocidade de enraizamento, avaliadas em fase de casa de vegetação, nas diferentes estações do ano. Observou-se maior taxa de sobrevivência das mudas nas estações inverno e outono, em relação à primavera e o verão. Também observou-se tendência de efeito positivo na produtividade das microcepas em relação às minicepas, indicando possível efeito de revigoramento/rejuvenescimento decorrente da enxertia seriada *in vitro*. A

micropropagação (cultivo in vitro e enxertia in vitro seriada) teve efeito positivo na produtividade do minijardim clonal, bem como foi observada a necessidade de menor tempo em casa de vegetação para enraizamento das microestacas e para o crescimento das mudas, em relação às mudas propagadas por miniestacas, conforme observados nos parâmetros de qualidade de mudas avaliados.

Palavras-chaves: Propagação vegetativa. propagação in vitro, micropropagação, microestaquia, microenxertia.

1. INTRODUÇÃO

A implantação de um minijardim clonal, a partir de plantas com maior grau de juvenilidade obtida através do revigoração/rejuvenescimento vegetativo, pode aumentar o potencial de produção de brotos, bem como melhorar o potencial de enraizamento dos propágulos e da qualidade das mudas produzidas.

Na miniestaquia, alguns clones apresentam dificuldades no processo de enraizamento adventício. Entre os fatores apontados para essa dificuldade, pode estar relacionado ao fato de o material vegetal utilizado ser proveniente de plantas na fase adulta. Neste sentido, Almeida et al. (2017), sugerem o uso da microestaquia (plantas propagadas in vitro), podendo aumentar a capacidade de propagação com fins comerciais.

Assim, a enxertia, quando utilizada na forma seriada e utilizando enxertos maduros em porta-enxertos juvenis, também tem sido indicada como técnica de revigoração/rejuvenescimento, podendo aumentar o potencial de enraizamento adventício (WENDLING et al., 2014). Da mesma forma, o uso da enxertia in vitro, ou a microenxertia, tem sido considerada como técnica de revigoração/rejuvenescimento de clones (XAVIER et al., 2021). Sendo uma possível alternativa, principalmente quando o material genético (clone) é de valor comercial e de difícil enraizamento, visando a microestaquia (DUTRA et al., 2009; XAVIER et al., 2021).

Em vista disso, Titon (2001) ao trabalhar com propagação vegetativa via miniestaquia e microestaquia de *Eucalyptus*, observou resultados de enraizamento superiores na microestaquia em relação à miniestaquia. Essa diferença foi melhor

observada em clones com maior dificuldade de enraizamento, indicando, nesses casos, possível efeito de rejuvenescimento dos clones com o uso da microestaquia.

Propágulos de plantas em estágios mais avançados de maturidade, quando passam por um maior número de subcultivos sucessivos *in vitro*, espera-se uma resposta de revigoração/rejuvenescimento quanto à habilidade rizogênica. No entanto, o número de subcultivos necessários para promover esta melhoria na capacidade de enraizamento tem sido específico para cada clone (MENDONÇA et al., 2020).

Neste sentido, pode-se mencionar alguns métodos utilizados para obter o revigoração/rejuvenescimento: a modalidade seriada aplicada à micropropagação, à enxertia, e ao enraizamento de miniestacas, bem como as combinações desses métodos (WENDLING et al., 2014). Assim, no rejuvenescimento de *Tectona grandis* por meio da enxertia e micropropagação seriadas, concluiu-se que a enxertia de propágulo maduros (35 anos de idade), não foi eficiente para formação de minijardim clonal (ANDRADE, 2010). Já o estabelecimento com mudas provenientes da micropropagação foi viável.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do revigoração/rejuvenescimento clonal realizado por meio da enxertia seriada *in vitro* em um clone de *Eucalyptus* sp., avaliando-se a produtividade das cepas em minijardim clonal na condição *ex vitro*, bem como a sobrevivência e o enraizamento das microestacas/miniestacas na produção das mudas clonais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Local da Experimentação

O experimento foi conduzido no Viveiro de Pesquisa do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa - UFV, localizado no município de Viçosa – MG.

De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo temperado quente-mesotérmico (Cwa), com verões chuvosos e invernos secos; apresenta precipitação média anual de 1.220 mm, temperatura máxima média de 26 °C e mínima média de 14 °C.

O clone C1 (*E. saligna*) foi estabelecido em minijardim clonal, em sistema hidropônico com fertirrigação em leito de areia, utilizando canteiro suspenso em com cobertura plástica de polietileno transparente.

2.2. Obtenção das minicepas e microcepas

Para a presente pesquisa, buscou-se avaliar as cepas formadas a partir de mudas produzidas pela miniestaquia, por minienxertos obtidos na condição ex vitro, microcepas produzidas por micropropagação (subcultivadas 13 vezes) e microcepas provenientes da enxertia in vitro seriada (I, II, III e IV subcultivos).

Para a obtenção de minicepas provenientes da enxertia ex vitro, foram utilizados como porta-enxertos sementes de *E. saligna*, as quais foram colocadas para germinar em tubete do tipo cônico, contendo quatro frisos longitudinais e equidistantes, com capacidade de 35 cm³, previamente desinfetados e preenchidos com substrato comercial (Carolina Soil®, Classe LXXXVI) composto por turfa, vermiculita, palha de arroz carbonizada, calcário e adubo de base (3g/L osmocote 15:9:12 3M e 6/L de super fosfato simples P19). Para a obtenção do enxerto, foram utilizados brotos do clone C1 coletados em minijardim clonal, utilizando-se a porção intermediária com aproximadamente 3 cm de comprimento e um par de folhas, com redução da área foliar, visando diminuir a transpiração. Com auxílio de um bisturi, foi realizada a decepa do porta-enxerto logo abaixo da folha cotiledonar, para evitar surgimento de brotos indesejados, e em seguida realizou-se corte em duplo bisel, usando a enxertia por garfagem em fenda cheia. Após a união de ambas as partes, essas foram envoltas por uma fita veda rosca e transferidas para a casa de vegetação climatizada (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa do ar ≥ 80 %), até a consolidação da enxertia. Em seguida, foram transferidas para casa de sombra onde permaneceram até serem transplantadas no canaletão, objetivando constituir as minicepas a partir de minienxertia ex vitro.

As microcepas originadas da enxertia in vitro seriada foram obtidas a partir da união do material vegetal do clone C1, com o porta-enxerto oriundo de sementes de *E. saligna*, desinfetadas e germinadas em tubo de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 400 mg L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona) e 5,5 g L⁻¹ de ágar

(Phytotechnology) como agente gelificante. Após o devido preparo do porta-enxerto e do enxerto, em condições assépticas, sob lupa binocular (Lupa Microscópio Estereoscópio 40x DI-724, Digilab®) e com o auxílio de pinças, procedeu-se a união de ambas as partes em enxertia in vitro por garfagem. Em seguida, as plantas enxertadas foram inoculadas em tubos de ensaio (vedados com tampa Bellco® culture tube closures, 25 mm) contendo 10 mL do meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995); adicionado 0,1 mg L⁻¹ de BAP, 0,1 mg L⁻¹ de ANA, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol., 800 mg L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona), 30 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado e 5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado a 120 °C, pressão de 1,0 Kgf cm⁻² durante 20 minutos.

A partir das plantas micropropagadas foram selecionadas matrizes para a confecção dos enxertos e minijardim clonal. Portanto, as microcepas foram obtidas a partir do alongamento das gemas advindas da micropropagação do clone C1. Foram selecionadas plantas (enxertadas in vitro e micropropagadas) com no mínimo 5 cm de altura e transplantadas para tubete do tipo cônico, contendo quatro frisos longitudinais e equidistantes, com capacidade de 35 cm³, previamente desinfetados, e preenchidos com substrato comercial Carolina Soil® (Classe LXXXVI), acrescentado de adubação de base [adubo de liberação lenta - Osmocote® 19:6:10 (3M) e Superfosfato Simples (19)]. As plantas foram aclimatadas inicialmente em estufim no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II, onde permaneceram por cerca de 15 dias e posteriormente foram transferidas para o Viveiro de Pesquisa do DEF/UFV. Inicialmente no viveiro, as plantas permaneceram por sete dias em casa de vegetação climatizada, sendo em seguida transferidas para casa de sombra, permanecendo por mais 20 dias, e então transplantadas para canaletão no minijardim clonal.

Para a obtenção das minicepas a partir de mudas de miniestaquia foram coletadas brotações do clone C1 estabelecido em minijardim, das quais foram confeccionadas miniestacas com cerca de 8 cm de comprimento e pelo menos dois pares de folhas, sem redução da área foliar. Para o enraizamento das miniestacas, utilizou-se como recipientes o tubete preenchido com substrato, conforme já mencionado anteriormente. As miniestacas permaneceram em casa de vegetação climatizada (umidade relativa acima de 85% e temperatura entre 20 e 30 °C) por 35 dias, sendo transferidas, em seguida, para casa de sombra por mais 15 dias para posteriormente serem transplantadas para canaletão no minijardim clonal.

2.3. Estabelecimento e manejo do minijardim clonal

As microcepas e minicepas foram estabelecidas e conduzidas em minijardim clonal (Figura 1 A), sob sistema hidropônico em leito de areia em calhas de fibrocimento de 0,80 cm de largura, 7,5 m de comprimento e 25 cm de altura, sob uma estrutura de plástico de polietileno transparente com 2,5 m de pé direito.

Em julho de 2022, as mudas clonais foram distribuídas e plantadas em espaçamento de 10 x 10 cm, com 8 plantas por linha, totalizando 100 micro/minicepas por metro quadrado e 18 micro/minicepas por tratamento. Desta forma, o minijardim clonal foi composto por minicepas obtidas a partir de miniestaquia e minienxertia, microcepas a partir de micropropagação e enxertia in vitro seriada (I, II, III e IV subcultivos).

Após a implantação das minicepas e microcepas (Figura 1 a) estas permaneceram cobertas por tela de sombreamento de 50% por uma semana. Após duas semanas, procedeu-se a poda de formação, retirando-se a parte apical das mudas para a quebra da dominância apical, assim induzindo as brotações axilares. A poda foi realizada a 8 cm de altura de cada muda, mantendo no mínimo dois pares de folhas remanescentes por minicepa.

As plantas foram fertirrigadas por um sistema de gotejamento, automatizado, acionados três vezes ao dia, numa vazão diária de 5 L/m²/dia. A solução nutritiva utilizada foi composta por: nitrato de cálcio (0,920 g L⁻¹), cloreto de potássio (0,240 g L⁻¹), nitrato de potássio (0,140 g L⁻¹), monoamônio fosfato (0,096 g L⁻¹), sulfato de magnésio (0,364 g L⁻¹), hidroferro (0,040 g L⁻¹), ácido bórico (2,800 mg L⁻¹), sulfato de zinco (0,480 mg L⁻¹), sulfato de manganês (1,120 mg L⁻¹), sulfato de cobre (0,100 mg L⁻¹) e molibdato de sódio (0,040 mg L⁻¹). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em torno de 2,0 mS m⁻², pH entre 5,5 a 6,5.



Figura 1 - Minijardim clonal em canaletão sob sistema hidropônico em leito de areia em calhas de fibrocimento para o clone C1 (*E. saligna*); **(A)** minicepas e microcepas em minijardim clonal (Barra = 10 cm); **(B)** muda proveniente de enxertia in vitro (Barra = 2 cm); **(C)** detalhe do ponto de união entre o enxerto e o porta-enxerto (Barra = 0,2 cm).

2.4. Delineamento experimental e avaliações

Para a determinação da produtividade de brotações das microcepas e minicepas, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, constituídas pelos tratamentos e coletadas em diferentes épocas do ano (primavera, verão, outono e inverno). As coletas foram realizadas semanalmente, sendo que cada coleta representou uma repetição, totalizando quatro coletas por época do ano. Foram contabilizados apenas os brotos com tamanho médio de 6 cm e com, pelo menos, dois pares de folhas.

O experimento de enraizamento de microestacas e miniestacas, foi conduzido em blocos ao acaso constituído pelos sete tratamentos e avaliados em diferentes épocas do ano, com quatro repetições e 10 microestacas/miniestacas por repetição.

Os tratamentos foram constituídos por: microcepas provenientes de enxertia in vitro - I subcultivo (T1); microcepas provenientes de enxertia in vitro - II subcultivo (T2); microcepas provenientes de enxertia in vitro - III subcultivo (T3); microcepas provenientes de enxertia in vitro - IV subcultivo (T4); microcepas provenientes de micropropagação subcultivada 13 vezes (T5); minicepas provenientes de enxertia ex vitro (T6) e minicepas provenientes de miniestacas (T7 - tratamento controle).

Para a produtividade de micro/miniestacas no minijardim clonal, a avaliação consistiu em contabilizar microestacas e miniestacas apicais produzidas por microcepas e miniestacas, respectivamente.

As micro/miniestacas foram avaliadas quanto à sua velocidade de enraizamento em casa de vegetação, obtidas pela avaliação da raiz aparente

observada na extremidade inferior do tubete (raiz aparente) e contabilizadas a cada dois dias.

Em área de pleno sol, após permanecerem por 30 dias, as mudas foram avaliadas quanto à percentagem de sobrevivência e enraizamento, o crescimento em altura, o vigor, o diâmetro de colo, massa seca da parte radicular e da parte aérea, bem como foi determinado o índice de qualidade de Dickson (IQD) e o volume de raiz das mudas produzidas (Figura 2).

Os dados obtidos em fase de casa de vegetação, a percentagem de enraizamento foi estimada pelo método Kaplan-Meier (Kaplan e Meier 1958); e a sobrevivência, utilizou-se o teste de Log-Rank (Mantel 1966) e Wilcoxon (Gehan 1965) para comparação de curvas de sobrevivência das micro/miniéstacas. Para os dados obtidos em fase de rustificação, foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Duncan em nível de 5% de significância. A análise dos dados foi realizada no software estatístico R versão 3.5.0.



Figura 2 - Características observadas para a avaliação de vigor das mudas aos 90 dias de idade: 1 - ruim (ausência de novas brotações); 2 - regular; 3 - médio; 4 - ótimo. (Barra = 3 cm), para o clone C1 (*E. saligna*) avaliado no presente experimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produtividade das microcepas/minicepas

Para a produtividade das minicepas/microcepas, foi observada diferença significativa entre as coletas realizadas nas diferentes épocas do ano (Figura 3), verificando que a maior produção de micro/miniéstacas foi no verão, com média de 17 brotos (Figura 3; Tabela 1).

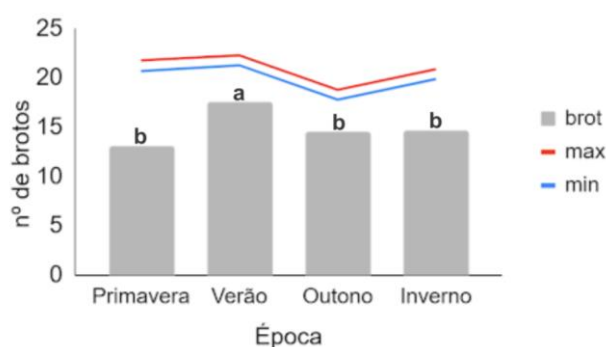


Figura 3 - Valores médios da produtividade (broto) mensal de microestaca/microcepa (enxertia in vitro seriada e micropropagação) e miniestacas/minicepa (minietaquia e enxerto ex vitro) nas diferentes épocas do ano, para o clone C1 (*E. saligna*). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$). Dados de temperatura máxima (max) e mínima (min); Fonte: INMET

Tabela 1 - Produtividade de estacas/cepas (microestacas/microcepa): T1, T2, T3, T4 e T5; e miniestacas/minicepas: T6 e T7), produzidas em minijardim clonal em sistema hidropônico em leito de areia, avaliados nas estações da primavera, verão, outono e inverno, para o clone C1 (*E. saligna*).

Época	Coleta	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	Média
Primavera	C1	5	4	4	4	4	6	3	4
	C2	3	3	4	3	3	3	3	3
	C3	3	2	2	2	3	3	2	2
	C4	4	3	3	4	4	4	3	4
	Mensal	15	12	13	13	14	16	11	13
Verão	C1	5	5	4	3	4	6	4	4
	C2	4	5	4	4	4	4	4	4
	C3	4	4	4	3	4	5	3	4
	C4	6	4	5	5	5	6	4	5
	Mensal	19	18	17	15	17	21	15	17
Outono	C1	6	5	5	5	7	3	3	5
	C2	4	3	4	4	5	3	4	4
	C3	3	4	4	4	4	3	4	4
	C4	4	4	4	3	4	3	3	4
	Mensal	17	16	17	16	20	12	14	16
Inverno	C1	2	3	2	2	2	3	2	2
	C2	3	3	4	4	6	3	5	4
	C3	4	5	3	5	5	5	4	4
	C4	4	4	5	4	3	4	4	4
	Mensal	13	15	14	15	16	15	15	15

A produtividade média mensal de estacas/cepa foi de 15 brotos (Tabela 1), oscilando entre 13 a 17 brotos. Segundo Trueman et al. (2013), ao avaliar a produtividade de brotos de matrizes de *Eucalyptus dunnii* em resposta à temperatura,

verificou que maiores temperaturas, 28 ° e 33 °C, favoreceram a produção de estacas em relação a menores, 18 ° e 23 °C,

Os resultados do presente trabalho foram superiores aos observados em um estudo realizado por Rocha et al. (2015), em minijardim clonal (espaçamento 10 x 10 cm) mantido em sistema hidropônico em canaletões em leito de areia. Os autores avaliaram a produtividade de miniestacas de um clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, observaram valor máximo de 9,7 brotos. cepa⁻¹.mês⁻¹. Outros resultados semelhantes também foram encontrados para o gênero *Eucalyptus* (TITON, et al., 2003; BRONDANI et al., 2012; PRATES, et al., 2019).

3.2. Velocidade de enraizamento das miniestacas/microestacas

Em relação ao enraizamento das micro/miniestacas, a primeira raiz aparente foi observada no 15º dia do verão (Figura 4 B), 18º dia da primavera (Figura 4 A) e 19º dia tanto no outono quanto no inverno (Figura 4 C e D, respectivamente). Para a velocidade de enraizamento, na primavera, foi observada que os tratamentos 1, 2, 3 e 5, apresentaram enraizamento mais rápido e atingiram valores de enraizamento superiores ao final da avaliação (39 dias), quando comparados com os tratamentos 4, 6 e 7. Para o verão, o tratamento 7 manteve a percentagem de enraizamento em comparação com o verão, no entanto, foi observado uma redução na velocidade de enraizamento dos tratamentos 1, 3 e 5 (Figura 4 e Tabela 1).

Na avaliação de enraizamento das micro/miniestacas, o comportamento rizogênico da miniestaca do tratamento 6 apresentou a menor taxa (45 e 55%), respectivamente na primavera e no verão. As microestacas dos tratamentos 2 e 5, apresentaram as maiores taxas (verão e primavera, respectivamente) atingindo 80% de enraizamento (Figura 4).

A velocidade de enraizamento no outono e inverno (Figura 4 C e D) observou-se maiores percentagens de enraizamento para os tratamentos T6 e T5 para o outono e T1, T4 e T5 durante o inverno. Contrariando os resultados de enraizamento observados na primavera, verão e inverno, foi verificado um aumento na taxa de enraizamento no outono do tratamento T6 (Figura 4 C), visto que este apresentava percentagem de enraizamento menor em relação aos demais tratamentos.

O enraizamento das miniestacas do tratamento T7, manteve uma percentagem média em relação aos demais tratamentos, no entanto no outono sua percentagem foi o mais baixo observado (Figura 4 C).

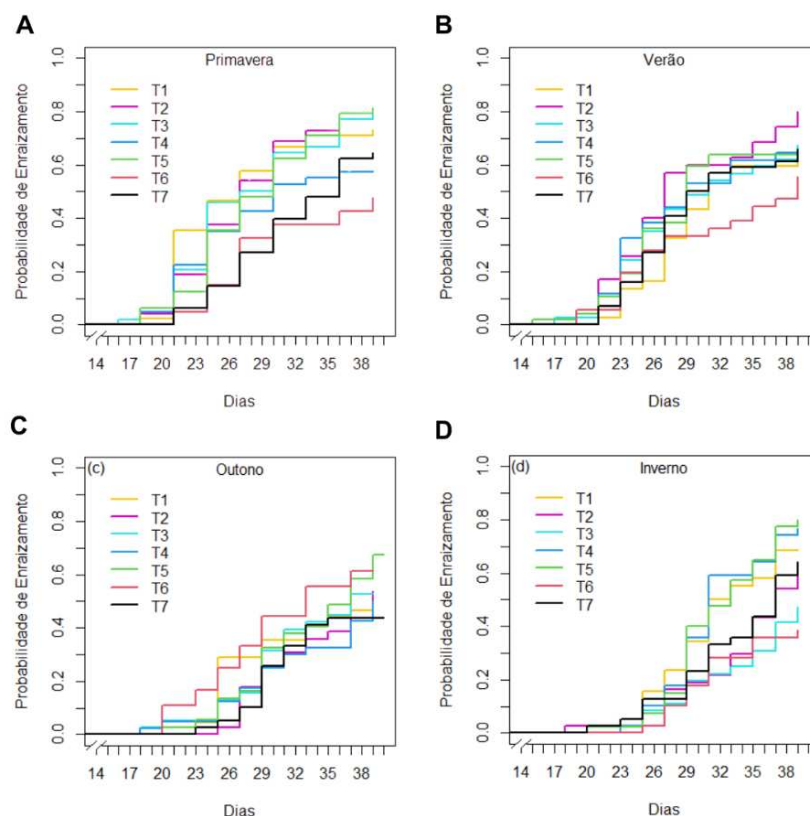


Figura 4 - Percentagem de enraizamento em casa de vegetação estimada pelo método Kaplan-Meier para o tempo de enraizamento de microestacas (T1, T2, T3, T4 e T5) e miniestacas (T6 e T7) do clone C1 (*E. saligna*), avaliados durante as estações da primavera (A), verão (B), outono (C) e inverno (D).

Os resultados do teste de Log-Rank e Wilcoxon mostraram que os tratamentos T1, T2, T3 e T5 foram significativamente diferentes dos tratamentos T6 e T7 (Tabela 2). No entanto, os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 apresentaram enraizamento semelhante entre si, bem como a comparação entre os tratamentos T6 e T7. Os resultados sugerem que propágulos vegetativos originados das microcepas, tendem a uma melhor resposta de enraizamento quando comparados aos propágulos provenientes de minicepas.

Tabela 2 - Teste de Log-Rank e Wilcoxon para comparação de curvas de sobrevivência de microestacas (T1, T2, T3, T4 e T5) e miniestacas (T6 e T7) do clone C1 (*E. saligna*), avaliados em fase de casa de vegetação.

Log-rank test			Wilcoxon test		
Tratamento	χ^2	p-value	Tratamento	χ^2	p-value
T1 versus T2	0,001	1	T1 versus T2	0,388	0,5
T1 versus T3	0,001	1	T1 versus T3	0,213	0,6
T1 versus T4	2,31	0,1	T1 versus T4	2,15	0,1
T1 versus T5	0,006	0,9	T1 versus T5	0,926	0,3
T1 versus T6	8,73	0,003	T1 versus T6	10,9	0,001
T1 versus T7	4,4	0,04	T1 versus T7	8,81	0,003
T2 versus T3	0,002	1	T2 versus T3	0,017	0,001
T2 versus T4	2,94	0,09	T2 versus T4	1,29	0,3
T2 versus T5	0,033	0,9	T2 versus T5	0,191	0,7
T2 versus T6	10,8	0,001	T2 versus T6	10	0,002
T2 versus T7	6,14	0,01	T2 versus T7	8,32	0,004
T3 versus T4	2,91	0,09	T3 versus T4	1,55	0,2
T3 versus T5	0,006	0,9	T3 versus T5	0,259	0,6
T3 versus T6	10,7	0,001	T3 versus T6	10,7	0,001
T3 versus T7	5,36	0,02	T3 versus T7	7,73	0,005
T4 versus T5	2,8	0,09	T4 versus T5	0,812	0,4
T4 versus T6	1,67	0,2	T4 versus T6	2,55	0,1
T4 versus T7	0,05	0,8	T4 versus T7	0,95	0,3
T5 versus T6	11	<0,001	T5 versus T6	9,05	0,003
T5 versus T7	5,76	0,02	T5 versus T7	6,65	0,01
T6 versus T7	1,72	0,2	T6 versus T7	0,903	0,3

Obs.: Os valores em negrito indicam significância ($p < 0,05$).

Clones com enraizamento de estacas mais rápido podem ter sua permanência em casa de vegetação reduzida, diminuindo o tempo necessário para a formação das mudas. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira et al. (2012), onde as microestacas apresentaram maior velocidade de enraizamento em relação a miniestacas. Neste sentido, segundo o mesmo autor, o rejuvenescimento de propágulos pode ser avaliado através dos percentuais de seu enraizamento e pela velocidade de enraizamento.

3.2. Sobrevivência e crescimento das mudas de microestacas e miniestacas

Houve interação significativa “época x tratamentos” para a característica sobrevivência em fase de crescimento (Tabela 3). Para as demais características foram observadas diferenças significativas dentro de tratamentos ou dentro de época.

Tabela 3 - Médias de sobrevivência (Sob.), enraizamento (Enr) e vigor (Vig) de microestacas (T1, T2, T3, T4 e T5) e miniestacas (T6 e T7), após 30 dias em fase de rusticificação, avaliados em diferentes épocas do ano (Epo), primavera (Pri.), verão (Ver.), outono (Out.) e inverno (Inv.), para o clone C1 (*E. saligna*).

Par.	Epo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	Méd.
Sob. (%)	Pri.	80,3 Abc	95,8 Aa	87,5 Aabc	75 Bc	91,7 Aab	75,5 Ac	76,4 Abc	83,1
	Ver.	82,9 Aa	94,4 Aa	94,1Aa	88,2 Aba	83,1 Aa	78,3 Aa	88,8 Aa	87,1
	Out.	97,5 Aab	85,0 Aabc	82,5 Abc	100,0 Aa	85,6 Aabc	85,0 Aabc	80,0 Ac	87,9
	Inv.	87,2 Aa	94,7 Aa	91 Aa	97,5 A	97,5 Aa	92,5 Aa	82,5 Aa	91,8
	Méd.	87	92,5	88,8	90,2	89,5	82,7	81,9	-
Enr. (%)	Pri.	78,2	89,6	85,4	70	83,4	67,5	65,7	77,1B
	Ver.	87,5	80	77,5	92,5	85,6	85	72,5	77,6 B
	Out.	87,5	80	77,5	92,5	85,6	85	72,5	82,9AB
	Inv.	87,2	89,2	87,9	97,5	97,5	85	80	89,5 A
	Méd.	85,1	84,7	82,1	88,1	88	80,6	72,7	-
Vig. (1-4)	Pri.	2,6	2,4	2,4	2,1	2,1	1,9	2,2	2,3 A
	Ver.	2,1	2,4	2,0	2,1	2,5	1,6	2,1	2,3 A
	Out.	2,1	2,5	2,0	2,1	2,5	1,6	2,1	1,9 B
	Inv.	2,5	2,2	2,1	2,9	2,2	1,9	2,1	2,3 A
	Méd.	2,3 a	2,4 a	2,1 ab	2,3 a	2,3 a	1,8 b	2,1 ab	-

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e letras minúsculas, na linha, não diferem pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

A porcentagem observada de sobrevivência de micro/miniestacas indicou uma variação de 75% a 100%, com média geral de 87,5% (Tabela 3). No entanto, as maiores médias de sobrevivência foram observadas nas épocas de temperaturas mais amenas do ano (87,9% e 91,8%). Dentro de tratamento foi observado diferença no T4 (enxertia in vitro - IV Sub.), sendo observadas diferenças entre a primavera em relação ao outono e inverno. De modo geral, foi observada ligeira melhora na porcentagem de sobrevivência das microestacas (enxertia in vitro) em comparação à miniestaca (T7).

Para o enraizamento das miniestacas e microestacas, a média geral obtida foi de 81,7%, com variação entre 65,7% e 97,5%. O enraizamento no inverno foi significativamente superior quando comparado às observações de primavera e verão.

Já para o vigor, as notas variaram de 1,6 a 2,9, com média de 2,2. Na primavera foi observado que o vigor do tratamento 1 (T1) foi significativamente diferente apenas em relação ao tratamento 6 (T6).

Para o parâmetro altura das mudas, observou-se variação de 15,7 cm a 30,3 cm (Tabela 4) e média geral igual a 23,5 cm de altura. Já para o diâmetro de colo das mudas, observou-se diferença apenas entre os tratamentos T5 (micropropagação) em relação ao T6 e T7 (enxertia ex vitro e miniestaquia). Ainda as mudas dos tratamentos advindos de cultivo in vitro (enxertia in vitro seriada e micropropagação) apresentaram médias semelhantes. Em relação as massas secas da parte aérea, da raiz e total, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação de parâmetros de crescimento de mudas de miniestacas e microestacas: altura (h), diâmetro de colo (dc), massa seca de parte aérea (mspa), massa seca de raiz (msr), massa seca total (mst), índice de qualidade de Dickson (iqd) e volume de raiz (vol) do um clone C1 (*E. saligna*), após 30 dias em fase de crescimento, avaliados nas quatro estações.

Treatment	h (cm)	dc (mm)	mspa (g)	msr (g)	mst (g)	iqd	vol (mL)
T1	24,1 a	2,9ab	1,5 a	0,6 a	2,1 a	0,17 a	3,9 a
T2	25,3 a	2,9ab	1,7 a	0,6 a	2,3 a	0,18 a	4,2 a
T3	23,8 a	2,9ab	1,4 a	0,6 a	2,0 a	0,17 a	3,9 a
T4	23,0 a	2,9ab	1,9 a	0,6 a	2,6 a	0,20 a	4,0 a
T5	25,0 a	3,2a	1,5 a	0,5 a	2,0 a	0,16 a	3,8 a
T6	21,0 a	2,6b	1,5 a	0,5 a	2,0 a	0,16 a	3,3 a
T7	22,1 a	2,6b	1,3 a	0,3 a	1,6 a	0,12 a	2,9 a
Época							
Primavera	30,3 A	3,4 A	1,6 B	0,7 A	2,4 B	0,21 AB	6,0 A
Verão	25,3 B	2,9 B	2,4 A	0,7 A	3,1 A	0,24 A	3,6 B
Outono	15,7 D	2,5 C	1,2B BC	0,4 B	1,6 C	0,17 B	2,8 C
Inverno	22,6 C	2,6 BC	1,0 C	0,3 B	1,3 C	0,05 C	2,4 C

Obs.: Médias seguidas da mesma letra maiúscula, dentro da mesma época, e letras minúsculas, dentro do tratamento, não diferem pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Em relação ao índice de qualidade de Dickson, observou-se menor média para as mudas produzidas no inverno. Em relação ao volume das raízes das mudas produzidas, houve tendência de menores valores nas estações mais frias do ano.

Para a sobrevivência das micro/miniestacas, foram observadas maiores médias de sobrevivência das micro/miniestacas no inverno, isto pode ser explicado devido às temperaturas mais amenas, diminuindo estresses dos propágulos. Costella (2021), obtendo a maior média de sobrevivência de miniestacas de um clone de *E.*

saligna, no verão (94,7%). A sobrevivência dos propágulos nas fases iniciais não assegura o êxito no enraizamento, no entanto pode preceder os resultados positivos ou negativos do enraizamento.

Neste sentido, a média de enraizamento com melhor desempenho verificado também foi no inverno. O que condiz com estudos registrados na literatura para a espécie em questão (LIMA et al., 2020). O oposto também foi observado, onde temperaturas mais elevadas favoreceram o enraizamento de *E. saligna* (CORRÊA e FETT-NETO, 2004).

Por outro lado, o enraizamento adventício pode ser influenciado pelo genótipo, as condições fisiológicas e nutricionais da fonte de propágulos, fatores ambientais (temperatura, umidade e luminosidade), o substrato utilizado, bem como a idade ontogenética (XAVIER et al., 2021; WILSON, 1998; BONGA e DURZAN, 1982). Para esta pesquisa, as plantas estavam em condições semelhantes e no mesmo ambiente, desta forma sugere-se que houve alteração na idade ontogenética ou no vigor das fontes de propágulos, induzidas pela técnica de propagação vegetativa utilizada.

A propagação vegetativa de plantas com boa formação das raízes adventícias é imprescindível e pode refletir na sobrevivência das mudas em campos, bem como da boa fixação da planta ao solo melhorando sua resistência a possíveis ventos (MOKOTEDI et al., 2010).

Os resultados observados para o presente estudo mostraram valores ligeiramente superiores a um estudo com miniestaquia da mesma espécie (*E. saligna*), realizado por Somavilla (2018), em que observou valores médios de altura de 15,28 cm, diâmetro de colo de 1,85 cm, massa seca de parte aérea de 1,13 g, massa seca de raiz de 0,24 g, massa seca total de 1,37.

Para os parâmetros de qualidade de mudas, no geral, as melhores médias foram observadas na primavera e verão. Estes resultados provavelmente se devem ao fato dessas estações apresentaram maiores temperaturas, dias mais longos e maiores valores de irradiância (GOULART e XAVIER, 2002).

4. CONCLUSÕES

- A enxertia seriada in vitro indicou ter efeito positivo na produtividade de microestacas em minijardim clonal para o clone C1 (*E. saligna*);

- As microestacas obtidas das microcepas advindas da enxertia seriada in vitro tendem a enraizar em menor tempo em comparação às miniestacas; bem como melhores respostas ao crescimento e de parâmetros de qualidade de mudas avaliados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, A. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: 2ª Ed. UFV, 2009, 500 p.

ALMEIDA, M. R., AUMOND, M., COSTA, SCHWAMBACH, J.; RUEDELL, C. M.; CORREA, L. R.; FETT-NETO, A. G. Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings. **Trees**, v. 31, p. 1377–1390, 2017.

ANDRADE, W. F. **Indução de rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L.f) através de enxertia seriada e micropropagação**. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba-SP, 75 p., 2010.

ANDREU, P.; MARÍN, J. A. In vitro culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as effected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, p. 258-267, 2005.

ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Revista Ciência Rural**, v. 38, n. 34, p. 967-973, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000400010>

BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; DIAS, J. M. M. Enxertia in vitro na propagação de clones de *E. urophylla* e *E. grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 223-232, 2006.

BONGA, J. M. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: BONGA, J. M., DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. Boston: Martinus Hijhoff/Dr W.; Junk Publishers, v. 5, p. 387-412, 1982.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; SANTIN, D.; BENEDETT.; E. L., ROVEDA, L. F.; ORRUTÉA, A. G. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate. **Scientia Agraria**, v. 8, p. 257–267, 2007.

BRONDANI, G. E., WENDLING I., DUTRA, L. F. GROSSI, F. Propagação Vegetativa de *E. benthamii* x *E. dunnii* por Miniestaquia. Colombo: Embrapa Florestas. n. 183, 2009, 42 p. (Embrapa Florestas, **Documentos**, 183)

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, M. A. de. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* x *E. ucalyptus dunnii*: (I) Sobrevivência de

minicepas e produção de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, v. 22, n.1, p.11-21, 2012.

CORRÊA, L. R.; FETT-NETO, A. G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Thermal Biology**, v. 29, p. 315-324, 2004.

COSTELLA, C. **O uso do estufim e a sazonalidade na produção de mudas de materiais genéticos recalcitrantes ao enraizamento**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 60 p., 2021.

DELIAS, D. S. **Características biométricas, trocas gasosas e atividade do sistema antioxidante de plantas de eucalipto durante o crescimento inicial**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 72 p., 2013

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 49-59, 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17093/1/Ar5.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2023.

GASPAR, R. G. B., WENDLING, I., STUEPP, C. A., ANGELO, R. C. Rootstock age and growth habit influence top grafting in *araucaria angustifolia*. **Cerne**. v. 23, n. 4, 2017.

GEHAN E. Um teste Wilcoxon generalizado para comparar amostras arbitrariamente censuradas individualmente. **Biometrika**, v. 52, p. 203–223. 1965. DOI: <https://doi.org/10.2307/2333825>

HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES JUNIOR, F. T., GENEVE, R. L. **Plant propagation; principles and practices**. 9 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2017, 1024 p.

HUANG, L. C.; CHOW, T. Y.; TSENG, T. C.; KUO, C. I.; LIU, S. M.; NGOH, M. G.; MURASHIGE, T.; HUANG, H. J. Association of mitochondrial plasmids with rejuvenation of the coastal redwood, *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 44, p. 25–30, 2003. Disponível em: <https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2003/1/bot441-04.html>. Acesso em: 15 dez. 2022.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório Anual 2022**. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2023.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. 2023. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos>. Acesso em: 20 dez de 2023.

KAPLAN, E.L.; MEIER, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. **Journal of the American Statistical Association**. v. 53, p. 457–481, 1958. DOI: <https://doi.org/10.2307/2281868>

LIMA, M.S.; ARAÚJO, MM, BERGHETTI, AIMI, S. C.; COSTELLA, C.; GRIEBELER, A. Mini-cutting technique application in *Corymbia* and *Eucalyptus*: effects of mini-tunnel use across seasons of the year. **New Forests**, v. 53, p. 161–179, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-021-09851-4>

MANTEL, N. Avaliação de dados de sobrevivência e duas novas estatísticas de ordem de classificação decorrentes de sua consideração. **Quimioterapia do Câncer**, v. 50, p. 163–170, 1966.

MARENCO, R. A.; GONÇALVES, J. F. C.; VIEIRA, G. Leaf gas exchange and carbohydrates in tropical trees differing in successional status in two light environments in central Amazonia. **Tree Physiology**, v. 21, p. 1311-1318, 2001.

MENDONÇA, E. G, BATISTA, T. R, STEIN, V. C.; BALIEIRO, F. P.; ABREU, J. R.; PIRES, M. F.; SOUZA, P. A.; PAIVA, L. V. In vitro serial subculture to improve rooting of *Eucalyptus urophylla*. **New Forests**, v. 51, p. 801–816, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-019-09761-6>.

MOKOTEDI, M. E. O.; WATT, M. P.; PAMMENTER, N. W. Analysis of differences in field performance of vegetatively and seed-propagated *Eucalyptus* varieties II: vertical uprooting resistance. Southern Forests: a **Journal of Forest Science**, v. 72, p. 31-36, 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.2989/20702620.2010.481131?needAccess=true>. Acesso em 15 nov de 2023.

MOORE R. (1991) Graft Compatibilities in vitro. Em: Bajaj YPS (eds) **High-Tech and Micropropagation I. Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 17, 1991. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8_5

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NANDA, A.K., MELNYK, C.W. The role of plant hormones during grafting. **Journal of Plant Research**, v. 131, p. 49–58, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0994-5>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5762790/> Acesso em: 8 dez. 2021.

NAVARRO L., ROISTACHER C. N., MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for vírus-free citrus. **Journal of American Society for Horticultural science**, v. 100, p. 471-479, 1975.

PERRIN, Y., DOUMAS, P., LARDETS, L. et al. Endogenous cytokinins as biochemical markers of rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) clone rejuvenation. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 47, p. 239–245, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02318978>

PRAKASH, O.; SHOOD, A.; SHARMA, M.; AHUJA, P. S. Grafting micropropagated tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] shoots on tea seedlings – a new approach to tea propagation. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 10, p. 883-888, 1999.

PRATES, G. de F.; GARCIA, F. A. de O.; PERES, F. S. B.; LOMBARDI, K. C. Citocinina na sobrevivência e produtividade de minicepas de *Eucalyptus benthamii* cultivadas em minijardim clonal. **Revista Engenharia na Agricultura**, v. 27, n. 3, p. 248–256, 2019. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/reveng/article/view/851>. Acesso em: 16 nov. 2023.

PIERIK, R. L. M. (1990). Rejuvenation and Micropropagation. In: NIJKAMP, H.J.J., VAN DER PLAS, L.H.W., VAN AARTRIJK, J. (eds) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Current **Plant Science and Biotechnology in Agriculture**, v. 9. 1990. Springer. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-2103-0_13. Acesso em: 02 nov 2022.

REVILLA, M. A., PACHECO, J., CASARES, A. RODRÍGUEZ, R. In vitro reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v. 32, p. 257–261, 1996. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02822697.pdf>. Acesso em ago.2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02822697>

ROCHA, J. H. T.; BORELLI, C. B.; KARLA; PRIETO, M. R.; SANTOS, A. J. M.; GODINHO, T. O. Produtividade do minijardim e qualidade de miniestacas de um clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (I-224) em função de doses de nitrogênio. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 273-279, 2015.

SANTIN, D.; WENDLING, I.; BENEDETTI, E. L.; MORANDI, D. **Enxertia seriada de erva-mate em viveiro e campo**, Pesquisa Florestal Brasileira (Online), v. 35, p. 409-418, 2015.

SOMAVILLA, L. M. **Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus* spp. cultivadas em diferentes manejos de minijardim clonal**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade de Santa Maria. 89 p., 2018.

TITON, M.; XAVIER, A.; REIS, G.G.; OTONI, W.C. Eficiência das minicepas e microcepas na produção de propágulos de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 27, n. 5, p. 619-625, 2003.

TRUGILLO, P., F.; LIMA, J., T; MENDES, L. M. Influência da idade nas características físico-químicas e anatômicas da madeira de *Eucalyptus saligna*. **Revista Cerne**, v. 02, n. 1, p. 1-15, 1996.

TRUEMAN, S. J; MCMAHON, T. V.; BRISTOW, M. Produção de mudas em resposta à temperatura do estoque da planta nos eucaliptos subtropicais, *Corymbia citriodora* e *Eucalyptus dunnii*. **New Forests**, v. 44, p. 265–279, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-012-9315-y>

VOLK, G. M.; BONNART, R., SHEPHERD, A. YIN, Z. Cryopreservation of citrus: predictions of different taxa and histological observations. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 128, p. 327-334, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1112-4>

XAVIER, A.; WEDLING I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. 3.ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2021. 275 p.

WENDLING, I. TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 1, p. 1-14, 2014.

VIDOY-MERCADO, I.; NARVÁEZ, I.; PALOMO-RÍOS, E.; LITZ, R.E.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Reinvigoration/ Rejuvenation Induced through Micrografting of Tree Species: Signaling through Graft Union. **Plants**, 2021, v. 10, 6^a ed., p. 1197. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10061197>

LINCOLN; T.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A., E.R. **Fisiologia vegetal**. 6^o ed, 888p. 2016. ISBN: 978-85-8271-366-2 8536316147, 9788536316147.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos objetivos propostos e nas condições experimentais do presente estudo, buscou-se avaliar a enxertia seriada in vitro como técnica de revigoração/rejuvenescimento na propagação in vitro e ex vitro de um clone de *Eucalyptus saligna* (C1), obtendo-se os seguintes resultados e conclusões:

- 1) Para a enxertia in vitro seriada como método de revigoração/rejuvenescimento, deve-se levar em consideração o tipo de porta-enxerto utilizado, bem como os sucessivos subcultivos, os quais têm influência no desenvolvimento dos enxertos.

- 2) A produtividade do minijardim clonal teve um ligeiro aumento na produtividade de brotos, quando a fonte de propágulos era advinda de enxertia in vitro e em relação a miniestaquia tradicional. A velocidade de enraizamento também resultou numa melhora, sendo necessário menos tempo de permanência das microestacas em casa de vegetação quando comparada à miniestaquia. As características de desenvolvimento das mudas também foram influenciadas pela enxertia in vitro.

- 3) O uso da enxertia in vitro seriada para a produção de microcepas na implantação de minijardim clonal em viveiro, pode ser uma alternativa ao aumento da produtividade, bem como melhorar a qualidade das mudas clonais produzidas por propagação clonal por miniestaquia.