



RODRIGO VIEIRA BALBI

**THE CELL REGENERATION AND CONECTION ON
GRAFTING BETWEEN PEAR AND QUINCE TREES IS
DEFINED BY CORTEX AND PHLOEM**

**LAVRAS - MG
2019**

RODRIGO VIEIRA BALBI

**THE CELL REGENERATION AND CONECTION ON GRAFTING BETWEEN
PEAR AND QUINCE TREES IS DEFINED BY CORTEX AND PHLOEM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr.Rafael Pio
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Balbi, Rodrigo Vieira.

The cell regeneration and connection on grafting between pear
and quince trees is defined by cortex and phloem / Rodrigo Vieira
Balbi. - 2018.

52 p. : il.

Orientador: Rafael Pio.

Coorientador: Fabrício José Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Grafting. 2. Anatomical compatibility. 3. Cellular
connection. I. Pio, Rafael. II. Pereira, Fabrício José. III. Título.

RODRIGO VIEIRA BALBI

**THE CELL REGENERATION AND CONECTION ON GRAFTING BETWEEN
PEAR AND QUINCE TREES IS DEFINED BY CORTEX AND PHLOEM**

**CORTEX E FLOEMA DETERMINAM O PROCESSO DE REGENERAÇÃO E
CONEXÃO CELULAR NA ENXERTIA ENTRE PEREIRAS E MARMELEIROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de outubro de 2018.

Dr. Ângelo Albérico Alvarenga	EPAMIG
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA
Dra. Marines Ferreira Pires	UFLA
Dr. Fabrício José Pereira	UNIFAL

Prof. Dr. Rafael Pio
Orientador

**LAVRAS – MG
2019**

À minha família e amigos.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à minha mãe Vera e a meu irmão Renato, por todo o apoio durante a minha caminhada na vida acadêmica.

Ao meu pai Temístocles e ao meu avô Hugo (*in memoriam*), pois sei que, mesmo não estando mais entre nós, estariam muito orgulhosos de me ver como um profissional na área da agricultura.

Aos grande amigos que deixei na adolescência quando saí de Congonhas, e aos grandes amigos que fiz durante os dez anos que estive em Lavras.

À toda a minha família, sejam eles de sobrenome Balbi, Vieira ou Vilela. Sei o quanto torceram por essa vitória e sou muito grato vocês.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Rafael Pio, por todo o apoio e conhecimento a mim transferidos e por todo o tempo que trabalhamos juntos.

Ao professor Dr. Fabrício José Pereira, meu coorientador. Sem o seu apoio a realização do trabalho não seria possível.

Ao Departamento de Agricultura e ao Programa de Fitotecnia/Agronomia, a todos os professores e servidores

Aos amigos e companheiros de trabalho do Pomar, em especial, à pós-doutoranda Daniela da Hora Farias pelo auxílio na parte final do trabalho. Todos foram de suma importância para a realização deste projeto, tanto no auxílio para desenvolver as atividades do trabalho quanto o apoio às questões pessoais durante todo o tempo em que convivemos juntos.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura, setor de Fruticultura, Arnaldo, Evaldo e Sr. Dedé por todo o empenho diário.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização dos cursos de Graduação, Mestrado e Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)) - Código Financeiro 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O porta-enxerto *Pyrus calleryana* possui restrições para as pereiras em virtude do alto vigor que proporciona à cultivar copa. A opção seria o marmeleiro (*Cydonia oblonga*) como porta-enxerto, porém não tolera solos ácidos. Outro possível porta-enxerto seria o marmeleiro da espécie *Chaenomeles sinensis*, porém, ainda, não apresenta compatibilidade com as pereiras. A alternativa seria o uso dos porta-enxertos *Pyrus calleryana* e *Chaenomeles sinensis* com interenxertos inter-*Cydonia oblonga*. No caso da enxertia, a literatura diverge quanto aos tecidos são responsáveis pela regeneração, o que precisa ser investigado com enxertias intergenéricas. O presente trabalho teve como objetivo quantificar as diferentes proporções dos tecidos, em combinações de porta-enxertos e interenxertos, no processo de obtenção de mudas da pereira. Em junho, realizou-se uma enxertia de mesa por garfagem da pereira Packham's triumph, nos interenxertos do gênero *C. oblonga* (cultivares Adams, BA-29, MA, MC e Sydom), para, então, garfos e interenxertos serem enxertados nos porta-enxertos *C. sinensis* e *P. calleryana*. Aos 150 dias após a realização da enxertia, foi avaliada a porcentagem de garfos brotados. Posteriormente, foi realizado o estudo da anatomia. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em fatorial 2 x 5, sendo o primeiro fator os dois porta-enxertos e o segundo fator, os cinco interenxertos do gênero *Cydonia* com três repetições de uma planta. Foram avaliadas uma lâmina, três cortes e cinco cortes, para cada repetição e realizada a média destes dados para cada repetição. As seguintes características foram avaliadas: as áreas dos raios parenquimáticos do xilema de cada componente de enxertia (enxerto, inter-enxerto e porta-enxerto); a área total da conexão, a área das conexões entre: xilema-xilema, floema-floema, floema-córtex e córtex-córtex; calcularam-se, também, as porcentagens do xilema, floema e córtex para todos os materiais; área do porta-enxerto; área do inter-enxerto; área do enxerto; área de conexão entre porta-enxerto/inter-enxerto; área de conexão entre interenxerto/enxerto e, por fim, áreas com ausência de conexão ou necrosadas. O índice de correlação foi calculado entre o percentual de tecidos e a área de conexão, e os dados foram considerados com correlação significativa, quando o R^2 apresentou valores $\geq 0,60$. Os tecidos que compõem o córtex e o floema são os responsáveis diretos pela regeneração e conexão celular entre os componentes envolvidos no processo de enxertia. O xilema apresenta uma contribuição pouco significativa durante essa etapa da enxertia. O porta-enxerto *Pyrus calleryana* apresenta uma compatibilidade maior com os interenxertos da espécie *Cydonia oblonga* e com a copa 'Packham's triumph'. A superioridade do porta-enxerto *Pyrus calleryana* está relacionada à maior proporção de córtex, o que favorece a regeneração e a conexão celular. Cultivares de materiais que contenham mais córtex e floema, no porta-enxerto ou enxerto, possuirão maior potencial para o sucesso no processo de enxertia. Os tecidos que compõem o córtex e o floema são responsáveis pela regeneração e conexão celular entre os componentes envolvidos no processo de enxertia. O porta-enxerto *Pyrus calleryana* apresenta compatibilidade maior com os interenxertos pela maior proporção de córtex. Espécies que contenham mais córtex e floema, no porta-enxerto ou enxerto, possuirão maior potencial para o sucesso no processo de enxertia.

Palavras-chave: Enxertia. Compatibilidade anatômica. Conexão celular.

ABSTRACT

Pear cultivation in the tropics currently requires the complex use of *Pyrus calleryana* or *Chaenomeles sinensis* rootstocks with *Cydonia oblonga* interstocks. However, there is a disagreement in the literature regarding the tissues that are responsible for regeneration during grafting, especially during intergeneric grafting. The objective of the present study is to quantify the different proportions of tissues in rootstock-interstock combinations established to obtain saplings. Packham's Triumph pear (crown) was double grafted by cleft grafting onto interstocks of *C. oblonga* (Adams, BA-29, EMA, EMC and Sydo cultivars), and these combinations were subsequently grafted onto *C. sinensis* or *P. calleryana* rootstocks. The sprouting percentage was evaluated 150 days after sprouting. Subsequently, the anatomy of the connections between the crown and interstock and the interstock and rootstock was examined. The following characteristics were evaluated: xylem parenchyma ray area of each grafting component (scion, interstock and rootstock); total connection area; connection areas between xylem-xylem, phloem-phloem, phloem-cortex, and cortex-cortex; percentage of xylem, phloem, and cortex for all materials; rootstock area; interstock area; scion area; rootstock/interstock connection area; interstock/scion connection area; and areas with no connection or with necrosis. The data were subjected to analysis of variance and the Scott-Knott test ($P \leq 0.05$), and correlations between tissue percentages and connection areas were calculated and considered significant when $R^2 \geq 0.6$. Only the tissues composing the cortex and phloem were positively correlated with the connection area. The *P. calleryana* rootstock has greater compatibility with the interstock due to its greater proportion of cortex. The xylem parenchyma rays do not significantly influence cell regeneration or connection. Therefore, woody species that contain more cortex and phloem in the rootstock and/or scion will have greater potential for grafting success.

Keywords: Grafting. Anatomical compatibility. Cellular connection. Parenchyma. Wood anatomy.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Importância econômica da pereira	11
2.2	Propagação	13
2.2.1	Enxertia	13
2.2.2	Porta-enxertos e interenxertos	15
2.2.3	Interenxertia	17
2.3	Compatibilidade e incompatibilidade no processo de enxertia	18
2.4	Importância do parênquima no crescimento secundário	21
2.5	Comportamento dos tecidos no processo de enxertia	22
2.5.1	Características anatômicas na técnica de enxertia	22
2.5.2	Crescimento desordenado na região de enxertia	24
2.5.3	Etapas subsequentes componentes da enxertia	25
2.5.4	Relevância dos tecidos no processo de enxertia	28
3	HIPÓTESES	30
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	31
	ARTIGO 1 - The cell regeneration and connection of grafting between pear and quince trees are defined by the cortex and phloem	31
	REFERÊNCIAS	48

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, o cenário do cultivo de pereiras não é nada animador. Com uma produção muito aquém da necessidade de consumo, faz-se necessária a importação de boa parte desta fruta consumida no país (FACHINELLO et al., 2011; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2018). São vários os fatores que contribuem, para essa baixa produção, dentre eles, a ausência de cultivares aptas ao cultivo nas diferentes regiões e a baixa tecnologia empregada para o cultivo.

A produção de mudas frutíferas enxertadas é diretamente dependente da escolha e obtenção de porta-enxertos ideais, que sejam compatíveis com a copa e propícios ao plantio, nos solos da região, onde serão cultivados. Esses porta-enxertos podem trazer inúmeras características benéficas à cultivar copa, como a melhoria no crescimento e desenvolvimento, ausência do período de juvenilidade, produção (qualidade, quantidade e precocidade), resistência a pragas e doenças, adaptação da planta a estresses abióticos, entre outras, resultando em uma alta de qualidade no plantio (HARTMANN, 2010).

No Brasil, utiliza-se, normalmente, o porta-enxerto da espécie *Pyrus calleryana* para a produção comercial de pereiras. Ele propicia copas muito vigorosas que dificultam os principais tratos culturais no cultivo. Em plantios comerciais europeus, utiliza-se o marmeleiro da espécie *Cydonia oblonga* como porta-enxerto, pelo efeito de nanismo, que proporciona redução do porte da planta e facilita, assim, os tratos culturais e aumenta a densidade de plantio. Porém, por sua vez, não apresenta boa capacidade de enraizamento, além de não tolerar temperaturas elevadas, na camada superficial do solo e nem solos ácidos (PIO et al., 2004). Por fim, acreditou-se que a utilização do marmeleiro *Chaenomeles sinensis* da espécie *Cydonia oblonga* poderia vir a ser alternativa para a produção de mudas de pereiras, porém ele não apresenta compatibilidade com as cultivares copa já estudadas (PIO et al., 2008).

Uma opção, a fim de se utilizar os porta-enxertos *Pyrus calleryana* ou *Chaenomeles sinensis*, para a produção de mudas de pereira, seria a utilização desses interenxertados com o marmeleiro *Cydonia oblonga*. Visto esta possibilidade, um estudo prévio das características anatômicas dessas espécies pode auxiliar no entendimento da eficiência da conexão celular.

Pesquisas voltadas às características anatômicas são de suma importância no entendimento do processo de regeneração e conexão celular na enxertia. O cenário atual está

representando por informações muito limitadas a respeito do comportamento dos diferentes tecidos envolvidos no processo de enxertia. Atualmente, quando o termo regeneração celular é abordado, evento esse indispensável, para que uma muda enxertada cresça e se desenvolva, até então não se verifica com exatidão quais tecidos estão diretamente relacionados a este ocorrido.

Apesar de a diferenciação do câmbio ocorrer, em combinações incompatíveis, não ocorre na mesma extensão que enxertos compatíveis, em que parte do calo permanece indiferenciado e se torna tecido parenquimatoso (ERREA; FELIPE; HERRERO, 1994). Por tais motivos, torna-se muito importante conhecer quais os tecidos realmente contribuem para a formação de calos e a conexão celular, pois, obtendo-se essa informação, torna-se possível a seleção de espécies e/ou cultivares que terão uma chance maior de sucesso com relação aos eventos contribuintes do processo de enxertia.

Diferentes autores divergem com relação aos tecidos e regiões que são realmente responsáveis pela conexão celular, cujas conclusões são meio subjetivas. Para Ribeiro et al. (2015), a região cortical deve ser preservada no processo de enxertia pela sua participação na formação de calos e, em consequência, na conexão celular. Segundo Ermel et al. (1997), células do câmbio e células mais jovens do floema, localizadas próximas à região de incisão, são as primeiras a se dividirem e contribuir para a conexão celular. Os autores, ainda, afirmam que o alinhamento dos tecidos, durante o processo de enxertia, pode ser um fator agravante, para a conexão celular e o desenvolvimento da muda, a fim de que os câmbios estejam alinhados e possam contribuir ao processo de conexão. A partir do momento, em que esteja comprovado qual o principal componente, no processo de regeneração celular, durante a enxertia, será possível uma seleção prévia de espécies e cultivares.

O presente trabalho teve como objetivo quantificar as diferentes proporções dos tecidos, em combinações de porta-enxertos e filtros, no processo de obtenção de mudas da pereira por dupla enxertia. Além disso, objetivou-se relacionar quais desses tecidos são mais importantes, no processo da enxertia, de acordo com sua relevância no processo de regeneração celular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica da pereira

Segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2018), 27.345.930 toneladas de pera foram colhidas, no mundo, no ano de 2016 e a China é o país com maior relevância para essa produção. Com uma área plantada de 1.116.085 hectares, na China, foram colhidas 19.388.063 toneladas da fruta, valor o qual que representa 70,89% da produção mundial. A ordem dos principais países produtores é seguida pela Argentina, Estados Unidos da América e Itália, com 905.605, 738.770 e 701.928 toneladas colhidas no mesmo período, respectivamente. Ainda, em 2016, o Brasil representou apenas 0,054% da produção mundial, com 14.905 toneladas colhidas, em uma área de 1.248 hectares, valor que deixa o país muito aquém de seu vizinho, Argentina, o qual representou mais de 3% de toda a produção do mundo.

Quando comparado ao cultivo de outras frutíferas de clima temperado, a pera representa apenas 0,65% do valor total no Brasil. Esse fator concomitante à baixa produção citada anteriormente faz com que o Brasil seja um forte importador da fruta no mercado mundial (FACHINELLO et al., 2011; IBGE, 2018). Em 2013, o Brasil importou 189.696 toneladas, 7,5% do total das importações mundiais, o que o tornou o segundo maior importador mundial de peras. Esse fato resultou em um gasto de US\$ 196.301.000 de importações de pera pelo Brasil, que representou, aproximadamente, 6,6% de toda a importação mundial de pera neste período. O principal fornecedor de peras ao Brasil, em 2016, foi a Argentina com a qual negociou 98.451.592 toneladas. Outros países, como Portugal, Espanha, Chile e Estados Unidos da América também desempenharam papel importante como fornecedores de peras para o Brasil (BRASIL, 2016).

Para Fachinello et al. (2011), a cultura da pera apresenta uma excelente oportunidade de mercado aos produtores nacionais. Quanto aos dados explanados, o país mostra uma oferta da fruta muito menor que a demanda exigida, porém não é o que tem acontecido na prática. Nos anos de 2015 e 2016, houve uma redução da área cultivada, resultando em uma queda também de produção. No ano de 2015, em 1.453 ha cultivados, foram colhidas 21.160 toneladas de pera. Porém, no ano seguinte, em uma área de 1.248 ha, foram colhidas 14.905 toneladas (IBGE, 2018). Segundo dados do IBGE (2016), Rio Grande do Sul (7.838 t), Santa Catarina (5.2016 t), Paraná (1.213 t), Minas Gerais (353 t) e São Paulo (285 t) são os principais estados produtores de pera no país.

Conforme Fioravanço (2007), foram várias as tentativas de promover o desenvolvimento do cultivo da pereira por diferentes incentivos. Todavia, não se pôde observar um crescimento da produção, nos principais estados produtores. Em oposição, tem-se analisada até mesmo a redução da produção em algumas áreas produtoras. Esse é outro fator que contribui muito para a alta taxa de importação já citada. Além disso, outra característica que impede a expansão do cultivo nacional é a falta de qualidade das cultivares utilizadas no país. Não havendo materiais que sejam adaptados às diferentes regiões de cultivo, há uma tendência de que a produção das pereiras não seja adequada, principalmente, quando comparada aos principais países produtores (PIO et al., 2007). Um modo eficiente de contornar tal situação seria o desenvolvimento de cultivares adaptadas a regiões de clima subtropical, como é o caso dos estados localizados no Sudeste brasileiro. Bettiol Neto et al. (2014) defendem que algumas cultivares, já lançadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), podem ser alternativas para a ausência de materiais adaptados a regiões de inverno ameno. Os autores acreditam que esse cultivo ocorre, possivelmente, pelo fato de terem sido lançados materiais híbridos (*Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia*), os quais são materiais mais rústicos, podendo então cultivá-los em regiões com menos horas de frio.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, Faoro (1999) acredita que a grande maioria dos pomares brasileiros sejam caseiros, ou seja, pomares de baixa tecnologia de produção. São utilizadas cultivares de baixa qualidade, como é caso de ‘Smith’, ‘Garber’, ‘Kieffer’ e ‘Le Conte’. Além do mais, segundo o autor, no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, pomares comerciais, em maior escala, estão começando a ser implantados, sobretudo, com cultivares europeias de boa qualidade. Essas pereiras, as quais são recomendadas ao plantio, nas regiões mais frias do Estado de Santa Catarina, são: ‘Packham’s Triumph’, ‘Williams’ e ‘Max Red Bartlett’. A falta de porta-enxertos adaptados às diferentes regiões de cultivo aliada à falta de viveiristas que produzam mudas de qualidade, também, torna-se um fator comprometedor ao avanço da tecnologia de produção nos pomares brasileiros (NAKASU; LEITE, 1990).

Outro motivo a ser considerado é o de que a região Sul do Brasil já apresenta toda a infraestrutura, para o cultivo de processamento de macieiras, o que pode vir a ser um grande potencial de expansão do cultivo da pereira. Por serem plantas semelhantes, toda essa infraestrutura se torna adequada à produção de peras também e, no caso da produção de maçãs, a região já apresenta um grande número de produtores, tornando-se uma possível diversificação para os produtores lá situados (FAORO, 1999).

O cultivo de pereiras é excelente alternativa a pequenos e médios produtores, contribuindo para a diversificação da fruticultura brasileira. Já se observa que produtores

veem como viável a produção de pera, no Brasil, inclusive, alcançando rentabilidades superiores às obtidas com a macieira, visto que a maçã nacional já atingiu o limite da demanda do país. Produtores que estão na área têm bons retornos econômicos, mesmo utilizando cultivares de baixa produtividade, por alta demanda aliada à baixa oferta, haja visto as altas taxas de importação citadas anteriormente. O melhoramento genético é de suma importância, para a obtenção de cultivares de baixa exigência de frio e com qualidade superior, sendo fundamental para que a cultura alcance novas áreas potenciais. Aliado ao melhoramento, estudos de manejo cultural, como a propagação vegetativa das mudas, são indispensáveis quando se pretende cultivar pereiras em regiões de frio ameno.

2.2 Propagação

2.2.1 Enxertia

A propagação pela reprodução sexuada não se adequa às características dos plantios comerciais pela alta desuniformidade, na produção das mudas, apesar de grande parte das frutíferas cultivadas apresentarem sementes viáveis. Deste modo, a alternativa mais viável, para o processo de formação de mudas aptas ao plantio é a propagação vegetativa. São inúmeras as vantagens da utilização desse método de propagação à produção de mudas de plantas frutíferas, podendo-se enfatizar a manutenção das características genéticas das plantas matrizes, uniformidade, porte reduzido e precocidade de produção. Dentre as principais técnicas de propagação vegetativa utilizadas, atualmente, na fruticultura, a enxertia figura talvez como sendo a mais importante, paralela à estaquia (HARTMANN, 2010).

A técnica de enxertia é baseada na união de partes de plantas distintas que, por meio da regeneração de seus tecidos constituintes, desenvolvem como uma única planta por meio da união física das partes envolvidas (JANICK, 1966). Dentre as principais características benéficas da utilização da enxertia, para a produção de mudas, podem-se destacar as principais: obtenção de populações homogêneas de plantas, manutenção das características desejáveis de clones selecionados, eliminação do período de juvenilidade e associação às características reprodutivas da cultivar copa e rusticidade do porta-enxerto (HARTMANN, 2010).

A enxertia consiste na combinação proposital de gemas ou ramos de uma planta com as raízes e a base de outra planta. O componente superior é denominado "enxerto" e o inferior "porta-enxerto". 'Autoenxertia' é o enxerto entre plantas da mesma espécie; "enxertia

interespecífica" é aquela que consiste de plantas de espécies diferentes; "enxertia intergenérica" é quando, além de serem de espécies diferentes, as plantas também possuem gêneros diferentes em sua classificação taxonômica. As combinações de enxertos, usadas na produção agrícola, são comumente compatíveis, já que tanto o enxerto quanto o porta-enxerto sobrevivem e se desenvolvem normalmente até o florescimento. No caso de enxertias compostas por plantas de espécies e gêneros diferentes, a chance de haver incompatibilidade é muito grande e ambos podem morrer após o processo (WANG, 2011).

Na atualidade, há uma busca por pomares cada vez mais adensados na fruticultura comercial, o que requer uma redução no porte das plantas. Essas características estão intimamente relacionadas com a facilidade de manejo, na área de produção, principalmente, nos tratamentos culturais, como poda e tratamentos fitossanitários (HARTMANN, 2010).

Segundo Johnson, Kreider e Miles (2011), para que haja sucesso no processo de enxertia, o câmbio do porta-enxerto e do enxerto deve estar bem alinhado e em contato um com o outro. As plantas copa e porta-enxerto devem, portanto ter diâmetros de haste semelhantes no momento da enxertia. Realizar um estudo preliminar, para determinar as taxas de crescimento de plantas porta-enxerto e enxerto, no ambiente em crescimento, é vital. Ainda, segundo o autor, os métodos de enxertia adequados variam, consideravelmente, de acordo com o tipo de culturas que serão utilizadas. No caso de plantas frutíferas, os métodos de enxertia mais utilizados são as enxertias por garfagem e borbulhia.

Fachinello, Hoffman e Nachtigal (2005) analisaram alguns passos essenciais para que o processo de enxertia obtivesse sucesso. Os autores corroboram com Johnson, Kreider e Miles (2011), a respeito do alinhamento de enxerto e porta-enxerto dos tecidos cambiais, os quais, por sua grande capacidade meristemática, serão responsáveis pela multiplicação desordenada de células, irregularmente diferenciadas, sendo denominadas calo. Logo em seguida, ocorre sua junção, formando apenas uma massa de calo em comum, que será responsável pela diferenciação das células, em novas células cambiais, promovendo uma união entre o câmbio do enxerto e do porta-enxerto. Por fim, serão produzidos novos tecidos vasculares pelo novo câmbio, recentemente diferenciado, permitindo o fluxo normal de água e nutrientes.

Além do método de enxertia, a época em que será realizado é, também, um fator diretamente relacionado com a taxa de sobrevivência das mudas, podendo ser totalmente determinante em uma taxa de pegamento satisfatória. É usual que frutíferas de clima temperado apresentem uma taxa de sobrevivência de mudas maior quando enxertadas no período de dormência das plantas (HARTMANN, 2010). Além disso, a realização da enxertia,

na época de dormência da planta, possibilita que os garfos e as borbulhas sejam coletados durante a poda de inverno. Para Pio et al. (2008), a enxertia é um dos processos mais críticos na produção de mudas, sendo que a eficiência vai depender da qualidade do porta-enxerto, gemas e garfos utilizados, da habilidade do enxertador e também de condições climáticas.

A intensa mão de obra e os altos custos resultantes da produção de mudas enxertadas já foram considerados problemas que impediam que essa tecnologia fosse amplamente adotada ao redor do mundo. No entanto, juntamente com o desenvolvimento de técnicas eficientes de produção comercial de mudas enxertadas e a introdução de novos porta-enxertos com características desejáveis compatíveis, a tecnologia foi, aos poucos, sendo introduzida em diferentes países da Europa, no início e, logo depois, no resto do mundo. Empresas internacionais não pouparam esforços de marketing com o intercâmbio de informações entre as comunidades de pesquisa. Como resultado, muitos países da Europa, Oriente Médio, Norte da África, América Central e Ásia adotaram a tecnologia, e as áreas que introduziram plantas enxertadas aumentaram, rapidamente, durante as duas últimas décadas (YASSIN; HUSSEN, 2015).

Embora a enxertia tenha um papel significativo na produção de frutas e hortaliças, o método ainda apresenta desafios que podem ser atribuídos à baixa difusão da tecnologia, entre eles, a ausência de conhecimento, quanto a diferentes porta-enxertos para cada espécie, que sejam resistentes ou tolerantes a doenças e nematoides nascidos no solo, ou ainda aptos aos diferentes solos encontrados, em determinadas regiões. Além disso, a falta de informações detalhadas sobre o grau dessa resistência/tolerância apresenta problemas para uma escolha adequada ao porta-enxerto. É interessante observar que porta-enxertos comerciais, considerados tolerantes a algumas doenças, reagem diferentemente à inoculação sob condições controladas. Outro aspecto relacionado às dificuldades referentes à difusão da enxertia está a resistência incompleta e o alto número de combinações de copa/porta-enxerto (YASSIN; HUSSEN, 2015).

2.2.2 Porta-enxertos e interenxertos

A escolha de um porta-enxerto ideal é de extrema importância no processo de formação de uma muda de planta frutífera. Esse fator interfere, diretamente, em características relevantes a um pleno desenvolvimento. A evolução da cultivar copa, ausência do período de juvenilidade, produção, resistência a pragas e doenças, adaptação da planta a estresses abióticos são algumas das principais peculiaridades provenientes de um porta-enxerto

adequado à produção da muda. Isso resultará em uma muda que apresenta as características fundamentais de cultivo desejadas (HARTMANN, 2010).

A redução do porte da planta é um dos aspectos principais na escolha certa do porta-enxerto. Plantas de menor porte favorecem os tratos culturais e ainda permitem o adensamento do pomar. A utilização de porta-enxertos e enxertos de gêneros diferenciados pode favorecer ainda mais a redução do porte da planta, pela menor afinidade entre os tecidos (HARTMANN, 2010). Todos os benefícios relacionados à utilização de porta-enxertos ideais à produção de uma muda frutífera já são de conhecimento de todos, porém é de suma importância destacar os percalços relacionados à falta de afinidade entre os materiais envolvidos na técnica de enxertia. Quando o porta-enxerto, pertencente a uma classificação taxonômica distante do enxerto, como é o caso das enxertias intergenéricas, a chance de se observar incompatibilidade entre os materiais é muito maior (FACHINELLO; HOFFMAN; NACHTIGAL, 2005).

No Brasil, os porta-enxertos ‘Taiwan Nashi-C’ (*Pyrus calleryana*) e ‘Taiwan Mamenashi’ (*Pyrus betulaefolia*) foram submetidos a diferentes avaliações em pesquisas, para a produção de mudas de pereiras, tendo alcançado algum sucesso. Apresentaram alta rusticidade, boa adaptação ao clima subtropical, que é extremamente fundamental, para se cultivar frutíferas de clima temperado em nossa região, tolerância a temperaturas elevadas e a solos úmidos e mal drenados, outra característica que pode ser encontrada, por aqui, além da baixa sensibilidade a nematoides e pulgão-lanígero (MASSERON, 1989). No entanto esses porta-enxertos proporcionam copas muito vigorosas, dificultando muito o manejo, como, por exemplo, atividades de poda e colheita (BARBOSA et al., 1997). Os porta-enxertos do gênero *Pyrus* são mais propícios a serem utilizados em pomares de baixa densidade. No caso de pomares de pereiras mais adensados, uma boa opção seria utilizar marmeleiros.

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) pertence à família Rosaceae e subfamília Pomaideae, sendo grupos taxonômicos compartilhados com a pereira, nespereira e macieira. Outro marmeleiro cultivado, ao redor do mundo, é o ‘marmelo do Japão’ ou *Chaenomeles sinensis* (*Chaenomeles sinensis* Koehne) (PIO et al., 2008). Segundo Ramos, Souza e Pasqual (1990), são ótimas opções de alternativas à obtenção de porta-enxertos, para as pomoideas, fazendo com que eles já sejam comumente utilizados em países da Europa.

Instituições, como a Empresa de Pesquisa e Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e o Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em trabalhos realizados, a fim de desenvolverem novos sistemas de produção de mudas do marmeleiro, obtiveram resultados satisfatórios com relação ao emprego de marmeleiro *Chaenomeles sinensis*, como porta-

enxerto para marmeleiros (PIO et al., 2005). Características como a quantidade de sementes por fruto (por volta de 150), número muito superior à espécie *C. oblonga* e sua taxa de germinação elevada foram consideradas como ideais, para a determinação de um novo porta-enxerto, para a cultura. O *Chaenomeles sinensis* ainda possui resistência à entomosporiose [*Entomosporium maculatum* (Lev.)], doença fúngica que pode acarretar prejuízos à lavoura. Além de todas essas particularidades, vigor e produtividade são também características da cultivar, tornando possível a utilização desse material como cultivar copa, produzindo frutos de características ideais para o processamento (ABRAHÃO; ALVARENGA; SOUZA, 1992).

Apesar de todas as características almejadas na utilização do marmeleiro *Chaenomeles sinensis*, como porta-enxerto a mudas de pereiras, há também obstáculos com relação à sua utilização. Pio et al. (2008) observaram incompatibilidade entre esse material e pereiras, tornando difícil o desenvolvimento da planta e comprometendo, assim, seu uso. Outra opção viável, no estabelecimento de mudas de peras aptas ao cultivo, em solos brasileiros, seria a utilização de porta-enxertos de marmeleiros, da mesma forma que nos plantios europeus. Todavia marmeleiros do gênero *Cydonia* também apresentaram características determinantes para a sua não utilização em território nacional. Na grande maioria de suas cultivares, a taxa de enraizamento é muito baixa, dificultando a propagação do material. Além disso, os marmeleiros do gênero *Cydonia* não toleram temperaturas elevadas na camada superficial do solo e nem solos ácidos (PIO et al., 2004).

Sendo assim, a situação atual é de que nenhum porta-enxerto, comumente empregado, para a produção de mudas de pereiras, apresenta todas as características desejadas pelos pesquisadores e produtores. O alto vigor conferido à cultivar copa, a incompatibilidade com as cultivares copa e o mal desempenho nos solos brasileiros fazem com que os gêneros *Pyrus*, *Chaenomeles* e *Cydonia* não sejam considerados ideais para a utilização. Uma opção viável pode ser a combinação desses materiais, por meio da dupla-enxertia, de modo que, de alguma forma, seja possível contornar os problemas observados quando se os utiliza diretamente com as cultivares copa.

2.2.3 Interenxertia

A interenxertia é uma técnica de propagação que permite à muda produzida contornar problemas observados na prática normal de enxertia. Com frequência, é empregada, quando se deseja resolver algum problema de incompatibilidade entre porta-enxerto e enxerto, ou quando se pretende diminuir o vigor de desenvolvimento da muda no campo. Essa técnica é

baseada na interposição de determinado fragmento do caule de uma planta entre o enxerto e o porta-enxerto. Com isso, uma planta submetida a esta técnica apresentará três constituintes geneticamente diferentes (porta-enxerto, interenxerto e enxerto) e duas regiões de enxertia (FACHINELLO; HOFFMAN; NACHTIGAL, 2005).

Usualmente, quando se utiliza a técnica de enxertia, é comum pensar nos componentes do processo sendo pertencentes à mesma espécie, ou o mais próximo possível nas classificações taxonômicas (ZARROUK et al., 2010). Porém houve um avanço significativo, na expansão da fruticultura, em todo o mundo. O cultivo de frutíferas, em regiões diferentes de seu centro de origem, trouxe também alguns problemas de adaptação, resultando em produções insatisfatórias e frutos de baixa qualidade. Por essas razões, surgiu a ideia da realização da enxertia entre genótipos que apresentem classificações taxonômicas mais distintas, como é o caso das enxertias entre marmeleiro (japonês e europeu) com pereiras (DARIKOVA et al., 2011).

No caso da utilização do marmeleiro *Chaenomeles sinensis*, para a produção de mudas de pereiras *P. communis*, a solução para o problema de incompatibilidade, já observada por alguns autores, pode ser o emprego de um interenxerto, o qual funcionaria como um canal de compatibilidade entre as partes envolvidas. Esse interenxerto também poderia contornar o entrave do alto vigor conferido à cultivar copa, quando se utiliza o porta-enxerto da espécie *P. calleryana*, para a produção dessas pereiras, resultando em plantas de menor porte no campo. A utilização de interenxertos evita a incompatibilidade de enxerto e porta-enxerto, sem reduzir o rendimento produtivo, embora possa diminuir o porte da planta (YONEMOTO et al., 2004).

Em virtude de a falta de afinidade entre os tecidos vasculares, mudas interenxertadas não apresentam alto vigor, tornando-se aptas a pomares de alta densidade. Porém essa mesma redução de porte da planta pode ser resultante da incompatibilidade no processo, que, a partir de determinado nível, irá comprometer o desenvolvimento normal da planta (DARIKOVA et al., 2011; HARTMANN, 2010; PINA; ERREA; MARTENS, 2012).

2.3 Compatibilidade e incompatibilidade no processo de enxertia

A união entre os tecidos no processo de enxertia é descrita por uma sequência de diferentes etapas em plantas lenhosas. Algumas frutíferas têm mostrado boa similaridade em estudos anatômicos relacionados a esse processo, como no caso de pessegueiro, macieira e pereira (ZARROUK et al., 2010). O processo pode ser resumido na adesão dos materiais

envolvidos na propagação, desenvolvimento de calo, estabelecimento de um novo tecido vascular e a formação de um sistema vascular funcional próximo à região de enxertia.

Para Hartmann (2010), o processo de regeneração pode ser definido e sequenciado do seguinte modo: inicialmente, após haver contato entre enxerto e porta-enxerto, células parenquimáticas proliferam dos materiais e são responsáveis pela formação dos calos, que, por sua vez, preencherão os espaços encontrados entre os dois componentes. Em seguida, esses calos se diferenciarão em células do câmbio, sendo responsável pela conexão entre os tecidos de porta-enxerto e enxerto. Ainda nesse mesmo estágio, há simultaneamente o início da diferenciação dos vasos condutores (xilema e floema), a princípio, pela diferenciação do xilema e, logo depois, do floema. Para finalizar o processo de estabelecimento da enxertia, essa camada cambial recém-formada começa sua atividade e, então, é responsável pela formação dos tecidos vasculares. Após a completa formação do xilema e floema, torna-se possível a conexão vascular entre porta-enxerto e enxerto.

Alguns autores acreditam que a formação dos calos, por meio das células parenquimáticas, pode ocorrer tanto entre materiais compatíveis como incompatíveis, não sendo assim um evento determinante para a determinação da compatibilidade no processo de enxertia. De acordo com Moore (1986), a formação do calo não representa um sintoma de compatibilidade, pois é proveniente de eventos, causando o não reconhecimento celular, sendo apenas uma reorganização citoplasmática disposta no material. Porém a regeneração e a junção dos vasos condutores de forma adequada são consideradas essenciais para que haja compatibilidade entre diferentes materiais nessa técnica de propagação (HARTMANN, 2010; PINA; ERREA; MARTENS, 2012).

O grau de afinidade entre as cultivares, no processo de enxertia, está diretamente relacionado com a proximidade entre os diferentes genótipos envolvidos no processo. Com a expansão da fruticultura no cenário mundial, foram surgindo problemas de adaptação, acarretando a queda da produção. Sendo assim, a busca por uma maior adaptação de diferentes cultivares, nas variadas regiões, teve como consequência a utilização do processo de enxertia entre genótipos, cada vez mais distintos, muitas vezes, pertencentes até mesmo a gêneros diferentes (PEREIRA et al., 2014).

A incompatibilidade é definida como sendo a incapacidade da perfeita união entre porta-enxerto e cultivar copa, ocasionando o crescimento anormal de uma planta enxertada, o que pode levar à morte prematura do enxerto por algum tipo de incompatibilidade fisiológica (MOORE, 1986). A incompatibilidade é evidenciada na região onde a enxertia foi realizada. Segundo Fontanazza e Baldini (1992), a incompatibilidade ocorre com uma continuidade dos

tecidos ou com sua descontinuidade. Em espécies lenhosas, a incompatibilidade com descontinuidade é caracterizada pelo maior crescimento do diâmetro no enxerto, levando à quebra da planta, ao longo dos anos, pelo fato de o porta-enxerto não ser capaz de sustentar a copa.

Os sintomas de incompatibilidade, em espécies lenhosas, incluem espessamento da casca, na região de união, folhas cloróticas, queda prematura de folhas, atraso na brotação, diferenças de vigor entre porta-enxerto e copa, engrossamento excessivo do caule abaixo, acima ou no ponto de união do enxerto, rompimento da união do enxerto, redução do crescimento vegetativo, baixa produtividade e morte prematura das plantas (HARTMANN, 2010; ZARROUK et al., 2010).

A definição de eventos capazes de determinar a incompatibilidade entre os tecidos é de suma importância para se conhecer quais as constituições genéticas serão compatíveis entre si. Há um grande interesse para que estes sintomas de incompatibilidade possam ser detectados o quanto antes, a fim de que se possa ganhar tempo, pelo fato de que algumas frutíferas podem apresentar sintomas de incompatibilidade, anos após a enxertia, como é o caso de algumas combinações de plantas do gênero *Prunus*. Esses sintomas localizados são caracterizados por irregularidades anatômicas na região de união dos tecidos e também por falhas na região cambial e na continuidade vascular (ZARROUK et al., 2010).

A incompatibilidade translocada consiste naquela em que os sintomas ocorrem de forma visível no desenvolvimento da planta. Pode ocorrer uma parada precoce no crescimento, amarelecimento das folhas com posterior avermelhamento, podendo haver a sua queda, redução do crescimento radicular e na translocação de carboidratos na região de união, havendo acúmulo na cultivar copa e falta no porta-enxerto (ZARROUK et al., 2010). Segundo Martínez-Ballesta et al. (2010), essa dificuldade de translocação, encontrada na região de enxertia, está relacionada com a ausência do número normal de células. Com um número reduzido de células e elementos do floema, há, de certa forma, um bloqueio no processo, resultando nos sintomas de incompatibilidade.

Já a incompatibilidade localizada apresenta poucos sintomas externos, de forma que podem demorar anos para que sejam evidenciados. A incompatibilidade localizada é melhor explicada, quando comparada à translocada, sendo relacionada à má formação estrutural na região de enxertia. Pode haver necrose no tecido cambial, resultando na ruptura da enxertia (PEREIRA et al., 2014). Mosse (1962) definiu a principal consequência dessa incompatibilidade, os problemas físicos encontrados na região de união do enxerto. Segundo o autor, o desenvolvimento anormal dos tecidos, encontrados no ponto de enxertia, resulta na

formação de tecidos vasculares que não são completamente lignificados, provocando uma falha na porção vascular e cambial. Quanto maior o grau de descontinuidade na região, maior será o retardamento no processo de crescimento na planta.

2.4 Importância do parênquima no crescimento secundário

Verifica-se que, para haver continuidade de desenvolvimento pós-enxertia, é essencial que haja conexão de tecidos vasculares entre porta-enxerto e enxerto. Porém, para que isso ocorra, deve haver um desenvolvimento de novas células, as quais serão responsáveis por manter a conexão entre o enxerto e porta-enxerto. Essas novas células podem ser provenientes de diferentes tecidos pertencentes aos componentes de enxertia. Acredita-se, portanto que, dentre os diferentes tecidos encontrados nas estruturas secundárias de vegetais, haja diferença em sua capacidade de contribuir para a conexão entre porta-enxerto e enxerto. Análises de enxertos compatíveis e incompatíveis podem resultar em um melhor entendimento desses fatores (EVERT, 2006).

Ao se estudar qualquer processo que envolva regeneração ou diferenciação celular, é imprescindível abordar as células de parênquima. As células do parênquima que ocorrem no xilema e no floema desempenham um papel importante como auxiliares no movimento da água e no transporte de fotoassimilados. Em termos de desenvolvimento, células de parênquima são relativamente indiferenciadas, ou seja, não especializadas morfológica e fisiologicamente, comparadas com as células componentes de tecidos mais especializados. As células do parênquima podem apresentar alterações em suas funções em virtude do processo de desdiferenciação, o que as torna muito importantes no processo de regeneração celular (EVERT, 2006).

As células do parênquima são capazes de retomar a atividade meristemática: desdiferenciar e dividir-se, em razão dessa capacidade. Essas células que apresentam apenas paredes primárias desempenham um papel importante na cicatrização de feridas, regeneração, formação de raízes e brotações adventícias e, por fim, na união de enxertos. Pelos fatores citados acima, são células consideradas totipotentes. As células parenquimatosas associadas aos tecidos vasculares primários e secundários são formadas pelo procâmbio e pelo câmbio vascular, respectivamente (EVERT, 2006).

No xilema secundário, as células do parênquima estão comumente presentes, em duas formas: parênquima axial e parênquima radial. No caso do parênquima axial, suas células são derivadas de formas iniciais fusiformes alongadas do câmbio vascular e, em consequência,

seus longos eixos são orientados verticalmente no caule e na raiz. Os raios parenquimáticos e as células do parênquima axial do xilema secundário, em geral, possuem paredes secundárias parcialmente lignificadas. As células do parênquima do xilema apresentam conteúdos bem variáveis, os quais são particularmente conhecidos por seu armazenamento de reservas energéticas na forma de amido. Em muitas árvores decíduas da zona temperada, o amido se acumula, no final do verão ou início do outono e declina, durante a dormência, à medida que o amido é convertido em sacarose nas baixas temperaturas de inverno (EVERT, 2006).

Já no caso do floema, ele contém números variáveis de células de seu parênquima, que constituem um tipo celular diferente, em morfologia e função, comparado com as células companheiras e células de Strasburger (albuminosas). Células de parênquima, contendo várias substâncias, como amido, taninos e cristais, são componentes regulares do floema. As células parenquimáticas formadoras de cristais podem ser organizadas, em pequenas células, cada uma contendo um único cristal. Essas células cristalíferas são comumente associadas com fibras ou esclereídeos e possuem paredes lignificadas com espessamentos secundários. Ainda, no floema secundário, as células do parênquima ocorrem em dois sistemas, o axial e o radial e são classificadas como células do parênquima axial e células do parênquima radial, respectivamente (EVERT, 2006).

Um bom exemplo de uma parte da planta que consiste, em grande parte, por células do parênquima é o córtex de caules. O parênquima cortical é um tecido que se posiciona internamente à epiderme e pode ocorrer em caules e raízes. Por ser um tecido formado quase em sua totalidade por parênquima, o córtex é considerado com alta capacidade de se desdiferenciar, dividir e rediferenciar. Para Evert (2006), esse fato o torna muito importante na cicatrização de feridas e regeneração. Sendo assim, o córtex se torna um dos tecidos com maior potencial para contribuir ao processo de enxertia.

2.5 Comportamento dos tecidos no processo de enxertia

2.5.1 Características anatômicas na técnica de enxertia

O sucesso da enxertia depende da compatibilidade entre o porta-enxerto e o enxerto. Conforme Goldschmidt (2014), enxertos em gêneros diferentes de uma mesma família raramente são compatíveis, mas aqueles com diferentes espécies do mesmo gênero podem sobreviver, formando uma união efetiva. A maioria dos auto-enxertos é compatível, com exceção das monocotiledôneas. Como a ferida necessária para o enxerto interrompe o sistema

vascular da planta, a reconexão do sistema é necessária para manter o transporte normal de água e nutrientes. A maioria das monocotiledôneas não tem câmbio vascular, o que pode ser um dos motivos pelos quais o enxerto falha. Isso sugere ainda que a diferenciação vascular, durante a cicatrização de feridas, é um pré-requisito para um enxerto bem sucedido. Segundo Wang e Rongling (2017), quando o câmbio do enxerto se junta totalmente ao do porta-enxerto, as células intactas se dividem e proliferam em calos, que eventualmente se diferenciam em formas de vasculatura e plasmodemata.

A eficiência, na brota dos enxertos durante o processo, está diretamente relacionado à regeneração celular dos tecidos envolvidos nessa técnica de propagação. Havendo maior regeneração e conexão entre esses tecidos, há mais chance de que a planta sobreviva e dê origem a uma muda vigorosa. Visto isso, acredita-se que os diferentes tecidos encontrados, no caule, o qual é utilizado, para a propagação de enxertia pelo método da garfagem, apresentem papéis diferentes, podendo desempenhar maior relevância ao sucesso na propagação

Segundo Yeoman et al. (1978), onde há compatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, há uma conexão dos elementos vasculares de ambos para então retomarem sua função natural. Contudo, ao se analisar materiais incompatíveis, esse fato não foi observado. Segundo esses autores, o evento estrutural crítico, para haver compatibilidade, ocorre, quando novas células geradas, a partir da periferia, sobressaem-se e entram, então, em contato físico. Os autores sugerem que o sucesso ou o fracasso dessa união depende do reconhecimento celular ocorrido por meio de divisões das células dos tecidos vasculares e, também, da proliferação de células do córtex.

Jefree e Yeoman (1983) notaram que as células adjacentes à região exposta à incisão na zona de enxertia entre porta-enxerto e copa são estimuladas a se dividir, dando origem a calos em até 48 horas pós-enxertia. Segundo os autores, essa formação de calo está associada ao câmbio vascular, ao parênquima do floema, ao parênquima do xilema e às camadas mais externas do córtex. Ainda segundo os autores, novas células são proliferadas lentamente na medula e no córtex interno. Essa atividade mitótica é mais pronunciada no enxerto que no porta-enxerto, podendo refletir a capacidade fotossintética superior do enxerto, mas os tecidos que dão origem às novas células são os mesmos em ambos. Em enxertias realizadas com o tomateiro, observou-se um aumento do tamanho de células, na região de contato entre porta-enxerto e copa, sendo esse aumento responsável pelo contato entre as partes envolvidas na enxertia, fazendo com que haja conexão entre elas. Essas células apresentam paredes celulares extremamente finas e citoplasma altamente vacuolado.

2.5.2 Crescimento desordenado na região de enxertia

Já é reconhecido que a formação de calos, na região de enxertia, é proveniente do ferimento causado. Porém, em estudos realizados com enxertos de damasco, introduzidos em porta-enxertos de ameixeira, observou-se que apenas alguma parte dos calos foi diferenciada, a partir do câmbio, nos demais tecidos vasculares e córtex, sendo que grande parte dos calos não chega a se diferenciar (PINA; EREA, 2005). Essa falta de diferenciação compromete as futuras conexões vasculares, resultando em descontinuidades do câmbio e em um acúmulo de células de parênquima. Sintomas como a descontinuidade da casca, disfunção cambial e acúmulo de amido no enxerto foram observados em enxertos de pereiras (ERMEL et al., 1997). Porém, segundo o autor, mesmo com esses sintomas, pouca necrose foi observada na região de contato da enxertia.

Segundo Melnyk (2015), trabalhos com marcadores de identidade celular são informativos para entender quanto as células estão contribuindo e a sua importância para a formação da junção do enxerto. Ao se estudar hastes de *Arabidopsis*, na região da inflorescência, os marcadores associados à divisão celular são regulados à medida que as células do parênquima se dividem (ASAHINA et al., 2011). Nos hipocótilos, as divisões celulares ocorrem, dentro de dois a três dias após a enxertia, nos tecidos vasculares, ao redor da junção do enxerto (MELNYK et al., 2015; YIN, 2012). Células no corte se expandem para preencher a lacuna e se assemelham a protoplastos com paredes celulares muito finas (JEFREE; YEOMAN, 1983; MELNYK et al., 2015). Na maioria das espécies de plantas, o calo se forma e preenche as lacunas entre os tecidos adjacentes para permitir o contato entre os tecidos do enxerto e porta enxerto (GARNER; BRADLEY, 2017).

O fato de a formação de calos ser importante, para promover o enxerto em muitas plantas, já é reconhecido, indicando que a importância dessa estrutura deve ser específica para cada espécie (GARNER; BRADLEY, 2017). Entretanto, se esses calos são uma causa ou consequência de um enxerto bem sucedido, permanece como uma hipótese, todavia ainda sem confirmação. Os tipos de células que dão origem a calos na junção do enxerto, também, são desconhecidos, mas as células no tecido vascular são boas candidatas, uma vez que, em trabalhos moleculares realizados, ainda, com plantas do gênero *Arabidopsis*, o marcador WIND1 é fortemente expresso. O WIND1 é um marcador molecular em hipocótilos de *Arabidopsis*. É fator de transcrição ativado, ao redor da ferida e sua expressão promove a desdiferenciação e divisão celulares, para formar calos induzidos pela lesão (MELNYK, 2016).

Segundo Yin (2012), surpreendentemente, os hipocótilos de *Arabidopsis* enxertados produzem pouco calo, embora já tenha sido observado que, quando cortados e não enxertados, o corte superior produz grandes quantidades de calos (MELNYK, 2016). Os autores também lembraram que, ao reduzir a capacidade de formar calos induzidos por feridas em *Arabidopsis*, suprimindo os alvos de WIND1, não houve efeito na conexão do floema. Juntos, esses dados sugerem que a formação de calo no enxerto não é um requisito absoluto para a formação bem-sucedida de enxerto ou conexão vascular.

2.5.3 Etapas subsequentes componentes da enxertia

Pouco se conhece, a respeito do surgimento dos primeiros sinais estruturais, causados durante o desenvolvimento da união entre porta-enxerto e enxerto. Para McCully (1983), eventos subsequentes foram caracterizados tanto para plantas lenhosas como não lenhosas e eles incluem a formação de uma camada necrótica, a adesão dos tecidos entre os dois materiais envolvidos no processo, a proliferação de calos na região de união e, eventualmente, diferenciação e junção do câmbio. Alguns autores sequenciam os eventos acontecidos no processo da enxertia de forma um pouco mais detalhada.

A necrose celular tem como consequência a descontinuidade vascular, na interface entre enxerto e porta-enxerto, que leva à ruptura da união, sendo a principal característica apresentada pela combinação de materiais incompatíveis. Já foi demonstrado que a ocorrência desses sintomas típicos requer contato efetivo entre os tecidos dos dois parceiros do enxerto, uma vez que a incompatibilidade pode ser superada pela inserção de um filtro mutuamente compatível, que é o caso da dupla-enxertia (MOSSE, 1958). Essas características permitiram a Mosse (1962) observar combinações de pereiras/marmeleiros incompatíveis, bem como Lapins (1959), o qual pôde observar tal incompatibilidade em damasqueiro/pessegueiro.

A camada necrótica pode apresentar função efetiva, para o contato entre porta-enxerto e enxerto, mas pode, também, contribuir para a falha mecânica entre os envolvidos. Segundo Noel (1968), ela pode limitar a dessecação, evitando a morte dos tecidos mais expostos. Diversos autores já analisaram essa camada, obtendo conclusões variadas e inconclusivas a seu respeito. Copes (1969) chamou-a de camada de contato, responsável pelo contato dos componentes do processo de enxertia. Para Stoddard e McCully (1979), apesar de se referirem ao material da célula morta entre os componentes do enxerto, também, como "camada necrótica", eles acreditam que a camada seja rompida, diluída e absorvida, presumivelmente, pelo calo proliferante à medida que a formação de união prossegue. A formação de calos, na

região de enxertia, pode “absorver” essa camada, fazendo com que ela desapareça com o tempo (ASANTE; BARNETT, 1997).

Melnyk (2016) destaca que os processos fundamentais, como divisão e diferenciação celulares, durante a enxertia, são provavelmente similares e altamente informativos para entender como as plantas regeneram a junção do enxerto. Os principais aspectos que irão influenciar esse processo são: a divisão celular, modificações da parede celular, respostas hormonais e diferenciação vascular. Além disso, outros fenômenos estão relacionados, como a cicatrização de feridas. O autor detalhou o processo de enxertia, ao longo do tempo, como sendo da seguinte forma: I) adesão da copa ao porta-enxerto; deposição de compostos na parede celular como, por exemplo, a pectina; formação da camada necrótica entre os componentes; II) início das divisões celulares pelo câmbio, córtex e células em torno de xilema e floema; III) a camada necrótica começa a se fragmentar; IV) os calos entre porta-enxerto e enxerto entram em contato; V) formação de parede celular nas células em comum entre porta-enxerto e enxerto; VI) diluição dessa parede celular e início da formação dos plasmodesmos entre as células de porta-enxerto e enxerto; VII) continuação da proliferação de calos e diferenciação do câmbio; posteriormente, xilema e floema se diferenciam; VIII) estabelecimento das conexões vasculares e IX) camada necrótica não é mais visível.

Existem diferentes estudos e hipóteses variadas, a respeito do desenvolvimento da união do enxerto, sendo o processo caracterizado em etapas subsequentes. Para Dolgun (2008), foram relatadas três etapas importantes: formação de calos, diferenciação e continuidade cambial e formação dos tecidos vasculares. Em estudo com o cajueiro, antes da formação do calo, houve ocorrência de secreção de uma resina, na superfície da ferida, como uma resposta inicial do dano tecidual, durante o corte do enxerto e do porta-enxerto. A resina fornece uma ligação temporária (meio de adesão) entre os dois parceiros, mas não contribui diretamente para a união. O acúmulo excessivo de camada necrótica pode resultar em falha mecânica de união. Foi observado, também, que a camada necrótica permaneceu na interface até que o calo tivesse se formado e, posteriormente, preencheu a interface do enxerto no trigésimo dia após o enxerto (MAHUNU et al., 2012).

A maioria das células do calo aumenta e divide-se, principalmente, no enxerto. Asante e Barnett (1997) mencionaram que a formação de calos é crucial, para a sobrevivência do enxerto, e o rápido contato físico das células calosas opostas, entremeadas e interceptadas, preenchendo os espaços entre o enxerto e o porta-enxerto, fornece uma ponte para o transporte de água e nutrientes. Segundo Dolgun (2008), a formação adequada e precoce de calo é importante, para a sobrevivência inicial do enxerto e posterior formação do câmbio e

dos tecidos vasculares. Ainda afirma que a correspondência adequada dos dois componentes contribui significativamente para o sucesso da união do enxerto.

No caso da enxertia em manga, todos os tecidos vivos que foram submetidos à incisão estavam envolvidos na formação de calos. A proliferação de calos nesses tecidos variou de acordo com a quantidade de tecido removido. O xilema secundário imaturo, raios e células do parênquima no córtex e na medula foram os principais locais de formação de calos (ASANTE; BARNETT, 1997). A formação de calos, a partir de células do xilema, foi relatada também em *Pinus ponderosa* (HARRIS; BARNETT, 1975). Copes (1969) observou que os principais contribuintes, para o crescimento de calos em *Pseodotsuga menziesii*, foram as células de parênquima de raios e floema, localizadas na zona das células de incisão. Barnett e Weatherhead (1988) constataram, em enxertos de coníferas, que os calos se originaram das células do parênquima e do câmbio.

Diferentemente do que a maioria acredita, Asante e Barnett (1997) ressaltaram que o câmbio não contribui tanto para a produção de calos no processo de enxertia, resultado que vai de acordo com o de Mergen (1954), ao observar que a maior parte do calo era produzida a partir de tecidos fora da zona do câmbio. Esses autores argumentam de forma antagônica à maioria dos estudos encontrados a respeito do processo de regeneração celular, visto que grande parte considera o câmbio como o principal responsável pela formação de calos.

Com todas essas diferentes formas de observar a formação dos calos, no processo de enxertia, em estudos com enxertia em mangueira, Asante e Barnett (1997) assinalaram que essa formação ocorre primeiro no porta-enxerto e somente mais tarde no enxerto. Esse fato pode ser atribuído a diferenças nas condições fisiológicas que prevalecem na copa e no porta-enxerto, como resultado de o enxerto ser isolado de fontes de nutrientes e água, enquanto o porta-enxerto permanece como uma planta funcional.

No caso do tomateiro, o enxerto bem-sucedido é um complexo processo bioquímico e estrutural que conecta o porta-enxerto e o enxerto. O evento inicial, na formação de uma união do enxerto entre copa e porta-enxerto, é a adesão de parênquima. Então, os elementos vasculares são regenerados por processos complexos, que incluem a diferenciação estrutural desse tecido em xilema e floema. As alterações anatômicas que ocorrem, durante a formação da união do enxerto, são: a morte das camadas celulares na interface do enxerto, a coesão do enxerto e do porta-enxerto, a proliferação de células calosas na interface do enxerto e a diferenciação vascular na interface do enxerto estabelecendo continuidade vascular (FAN et al., 2015; MARTINEZ-BALLESTA et al., 2010).

Fan et al. (2015) identificaram uma mudança rápida, na formação da união do enxerto no tomateiro, a adesão do parênquima. Na interface de enxertia com cinco, oito e onze dias de idade, as células desse tecido estavam em estado de divisão e algumas em expansão celular. Pequenas células de calos foram detectadas com poucos espaços intracelulares e com uma intensa atividade celular. Foram observados diferentes estágios de desenvolvimento, que incluíram divisão e alongamento celular, a proliferação de células de calo, que ocorreu, a partir da região medular ou dos feixes vasculares. A camada de isolamento desapareceu durante a proliferação e desenvolvimento do calo.

2.5.4 Relevância dos tecidos no processo de enxertia

Segundo Ribeiro et al. (2015), a relevância de preservar as camadas corticais é aparentemente relacionada à sua participação na formação de calos. A proximidade do sistema vascular (no porta-enxerto), por outro lado, é fundamental, pois favorece o acesso a substâncias nutritivas e à água, primordiais, durante as fases iniciais do desenvolvimento, após a microenxertia. A microenxertia em *Citrus* adotou como procedimento-padrão o posicionamento do ápice diretamente no córtex, por meio de uma incisão na periferia do porta-enxerto, enquanto o contato direto com os tecidos vasculares é prejudicial. A formação abundante de calos no porta-enxerto é essencial, para o sucesso da microenxertia em *P. edulis*, e a formação de uma camada necrótica também foi evidenciada como a primeira fase da microenxertia (YIN, 2012).

Ainda a respeito da microenxertia, no caso do maracujazeiro, a formação precoce de uma camada necrótica não foi observada, apenas a presença de material da parede celular residual de tecidos danificados. O tecido do calo teve um papel determinante à adesão do enxerto e à sua nutrição inicial, e a morte de células externas ao calo resulta na formação de tecido cicatricial que favorece o isolamento da região do microenxerto, provavelmente, diminuindo as perdas de água pelos tecidos da região conectiva; neste contexto, a origem do calo se deu pelas células do parênquima cortical (RIBEIRO et al., 2015).

Em estudos anatômicos da enxertia de maracujazeiros comerciais (*Passiflora edulis f. flavicarpa* e *Passiflora alata*) sobre a espécie *Passiflora cincinnata*, Zucarelli (2011) observou que, durante o início do processo de enxertia, grande quantidade de células passou por diferenciação celular. No parênquima cortical de ambas as espécies, as células diferenciaram-se e uniram-se à região cambial do porta-enxerto. Além disso, notou que um dos lados da região medular, o qual estava em contato com o porta-enxerto, apresentou

processo semelhante ao ocorrido no parênquima cortical, unindo-se à região medular do porta-enxerto Estruturas anômalas, consideradas por alguns autores como de cicatrização ou calos, foram observadas em várias regiões de contato entre o enxerto e o porta-enxerto.

Segundo Yeoman et al. (1978), onde há compatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, há uma conexão dos elementos vasculares de ambos para, assim, retomarem à sua função natural. Ao se analisar materiais incompatíveis, isso não foi observado. Esses autores, destacam, ainda, que o evento estrutural crítico, para que haja compatibilidade, acontece, quando novas células geradas, a partir da periferia, sobressaem-se e entram, dessa forma, em contato físico. Os autores sugerem que o sucesso ou o fracasso dessa união depende do reconhecimento celular ocorrido, por meio de divisões das células dos tecidos vasculares e, também, de proliferação de células do córtex.

Em combinações de enxertia entre pereira/pereira e pereira/marmeleiro, houve a ocorrência das primeiras divisões celulares, três dias após a enxertia, próximas à casca (ERMEL et al., 1997). Essas sucessivas divisões foram responsáveis pela formação dos calos na região de união entre os materiais. Independente das combinações avaliadas, os autores afirmam que tanto o porta-enxerto quanto o enxerto participaram de forma igual na formação desses calos. As células mais alongadas do câmbio e células mais jovens do floema, localizadas na camada celular mais próxima da região, em que houve a incisão, são as primeiras a se dividirem por mitoses. Ainda quanto à divisão e diferenciação celular, células do parênquima cortical raramente se diferenciam e participam do processo de formação dos calos. Já com relação às células do xilema, a sua capacidade de diferenciação é pequena em virtude da lignificação (ERMEL et al., 1997).

Já em estudos baseados na união de enxertia, utilizando a mangueira, Asante e Barnet (1997) notaram que as primeiras divisões celulares são observadas, três dias após a enxertia, provenientes de células do parênquima cortical e células de raio parenquimático do floema no enxerto. Com o passar do tempo, o estímulo causado pela incisão, na região de enxertia, vai além daquele local, fazendo com que as células da medula também comecem a aumentar e se dividirem. À medida que ocorram mais divisões celulares, o tecido necrótico vai sendo, cada vez mais empurrado, para a região de contato entre porta-enxerto e enxerto, resultando em contato entre as partes. Porém, em algumas partes, essa junção é comprometida pela sua permanência, evitando que haja contato. Passados dias da enxertia, os calos vão preenchendo toda a área periférica, unindo, então, os tecidos de córtex e indo em direção à medula.

3 HIPÓTESES

Existem diferenças anatômicas entre as combinações de porta-enxerto e filtro utilizadas no processo de enxertia. Essas diferenças refletem nas proporções dos tecidos vasculares secundários e córtex presentes nas diferentes combinações.

Existem diferenças nas funções desempenhadas por esses tecidos que compõem os enxertos, porta-enxertos e filtro no processo de enxertia.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

**ARTIGO 1 - THE CELL REGENERATION AND CONNECTION OF GRAFTING
BETWEEN PEAR AND QUINCE TREES ARE DEFINED BY THE CORTEX AND
PHLOEM**

Artigo formatado de acordo com a Revista Bragantia.

Abstract: Pear cultivation in the tropics currently requires the complex use of *Pyrus calleryana* or *Chaenomeles sinensis* rootstocks with *Cydonia oblonga* interstocks. However, the literature disagrees on which tissues are responsible for regeneration during grafting, especially during intergeneric grafting. The objective of the present study is to quantify the different proportions of tissues in rootstock-interstock combinations established to obtain saplings. Packham's Triumph pear (crown) was double grafted by cleft grafting onto interstocks of *C. oblonga* (Adams, BA-29, EMA, EMC and Sydo cultivars), and these combinations were subsequently grafted onto *C. sinensis* or *P. calleryana* rootstocks. The sprouting percentage was evaluated 150 days after sprouting. Subsequently, the anatomy of the connections between the crown and interstock and the interstock and rootstock was examined. The following characteristics were evaluated: xylem parenchyma ray area of each grafting component (scion, interstock and rootstock); total connection area; connection areas between xylem-xylem, phloem-phloem, phloem-cortex, and cortex-cortex; percentage of xylem, phloem, and cortex for all materials; rootstock area; interstock area; scion area; rootstock/interstock connection area; interstock/scion connection area; and areas with no connection or with necrosis. The data were subjected to analysis of variance and the Scott-Knott test ($P \leq 0.05$), and correlations between tissue percentages and connection areas were calculated and considered significant when $R^2 \geq 0.6$. Only the tissues composing the cortex and phloem were positively correlated with the connection area. The *P. calleryana* rootstock has greater compatibility with the interstock due to its greater proportion of cortex. The xylem parenchyma rays do not significantly influence cell regeneration or connection. Therefore, woody species that contain more cortex and phloem in the rootstock and/or scion will have greater potential for grafting success.

Keywords: Grafting, anatomical compatibility, cellular connection, parenchyma, wood anatomy.

Introduction

Pear trees are mainly propagated by grafting onto quince trees of the genus *Cydonia*. However, these quince trees do not adequately develop in tropical and subtropical regions, as they do not tolerate high temperature and acidic soil, which are common in such regions (SEIFERT et al., 2009). Nevertheless, the use of rootstocks from the *Pyrus* genus has the

advantages of adaptation to tropical and subtropical climates and resistance to fire blight (*Erwinia amylovora*); however, trees grafted onto these rootstocks grow vigorously, hindering the management of high-density orchards (BETTIOL NETO et al., 2014). Another option for pear tree rootstocks is the quince tree (*Chaenomeles sinensis*), but pear trees are incompatible with this species. An alternative strategy to cultivate pears in tropical and subtropical regions is to use *Pyrus calleryana* or *C. sinensis* rootstock with interstocks of *Cydonia oblonga* (quince). Such intergrafted seedlings do not present high vigour, making them suitable for high-density orchards. However, this reduction in plant vigour may be due to grafting incompatibility, which may compromise normal plants (DARIKOVA et al., 2011; PINA; ERREA; MARTENS, 2012). Due to these possibilities, understanding the anatomical characteristics of these species can elucidate their cellular connection efficiencies and possible incompatibilities.

The compatibility between different grafting materials depends on anatomical characteristics and the de-differentiation and subsequent differentiation of tissues important for plant physiology (ZARROUK et al., 2010). Although cambium differentiation occurs in incompatible combinations, in which part of the callus remains undifferentiated and becomes parenchymal tissue (ERREA; FELIPE; HERRERO, 1994), it does not occur in compatible materials. There is a clear disagreement among studies regarding which tissues and regions are responsible for cellular connections, and this disagreement has resulted in subjective conclusions. According to Ribeiro et al. (2015), the cortex region must be preserved during grafting because of its participation in callus formation and consequently in cellular connections. However, according to Ermel et al. (1997), cambium and phloem cells located near the incision region are the first to divide and contribute to the cellular connections. For these reasons, it is critical to identify which tissues contribute to callus formation and cellular connections to enable selection of species and/or cultivars with a greater likelihood of success in events contributing to grafting.

According to Moore (1986), the formation of calluses (prior to cellular connection) is not an indication of compatibility because calluses result from cellular non-recognition and are only a cytoplasmic reorganization of the materials. However, the adequate regeneration and junction of conducting vessels (called cellular connection) is essential for compatibility between different grafting materials (PINA; ERREA; MARTENS, 2012).

Detecting symptoms of incompatibility as early as possible is of great interest since some fruit trees may show symptoms of incompatibility years after grafting, as is the case for some combinations of trees in the *Prunus* genus (PINA; ERREA, 2005). These symptoms are

characterized by anatomical irregularities near the union of the tissues and by failures in the cambial region and vascular continuity (ZARROUK et al., 2010). Therefore, research is needed to identify non-connected areas at the grafting site (necrotic regions, gaps, etc.) and areas with tissue continuity (connected areas). This study presents a new approach to evaluate the areas and proportions of tissues at the grafting site and incompatibility symptoms.

In this study, we test the following hypotheses: a) living and less-differentiated tissues in the cortex and vascular tissues (especially the phloem) contribute more to grafting; and b) plants with a higher proportion of tissues with a greater influence on grafting lead to greater success in this process. Therefore, the objective of the present study was to quantify the different proportions of tissues in rootstock-interstock combinations established to obtain pear tree saplings by double grafting. In addition, the tissues that are most important to grafting are identified according to their relevance to cellular regeneration.

Materials and methods

The experiment was conducted at Universidade Federal de Lavras (Federal University of Lavras – UFLA) located in the municipality of Lavras, Minas Gerais state, Brazil. The site has a humid subtropical climate (Cwb) and is located at 21°14' south latitude and 45°00' west longitude and a mean altitude of 918 metres.

The rootstocks of *C. sinensis* and *P. calleryana* were produced from seeds according to the recommendations of Pio et al. (2009). When the plants reached a mean height of 90 cm and a diameter of 9 mm at the point of grafting (20 cm above the plant collar), the experiment was started.

Bench grafting was carried out by cleft grafting Packham's Triumph pear onto interstocks of *C. oblonga* (BA-29, Sydo, Adams, EMC, and EMA cultivars); the interstocks were then grafted by cleft grafting onto *C. sinensis* and *P. calleryana* rootstocks in a technique known as double grafting (SEIFERT et al., 2009). The clefts were wrapped with plastic tape and protected by clear plastic bags to generate a moist chamber and prevent the propagation material from drying out. The plastic bags were removed 30 days after grafting, and the tape was removed at 60 days (PIO et al., 2008). The seedlings were kept in a screened nursery (50% shading).

The experimental design was completely randomized in a 2 x 5 factorial arrangement with the first factor being the rootstocks (*C. sinensis* and *P. calleryana*) and the second factor the five *C. oblonga* cultivars (BA-29, Sydo, Adams, EMC, and EMA); there were four

replicates and 10 plants per experimental unit. One hundred and fifty days after grafting, the percentage of sprouted clefts was evaluated. The data were subjected to analysis of variance, and the means were compared by the Scott-Knott test at the 5% probability level.

Subsequently, anatomical examination was conducted by collecting pathogen-free portions of the stem at the grafting site for both the crown-interstock and interstock-rootstock combinations. Three samples from each site were collected to obtain cross-sections. Fragments of approximately 1.0 cm were removed from the stem segments for the samples. To make the permanent slides, the stem fragments were dehydrated in an ascending ethanol series and embedded in hydroxyethyl methacrylate resin (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) according to the manufacturer's protocol. The samples were sectioned using a Yidi YD-335 microtome (Jinhua Yidi Medical Appliance CO., LTD, Zhejiang, China).

Cross-sections with a thickness of 5.0 μm were generated with a sliding microtome, stained with astra blue/safranin (1% safranin and astra blue 0.1% at a ratio of 7:3), and mounted on Permount® synthetic resin. Images were captured with a Zeiss GmbH Scope.A1 optical microscope (Zeiss Microimaging, Heidelberg, Germany) coupled to a capture system and were later used to generate descriptions.

The following parameters were quantified to clarify which tissues were most responsible for the regeneration and subsequent development of the grafted seedlings: xylem parenchyma ray area of each grafting component (scion, interstock, and rootstock); total connection area; connection area between the xylem-xylem, phloem-phloem, phloem-cortex, and cortex-cortex; percentage of xylem, phloem, and cortex for all materials; rootstock area; interstock area; scion area; rootstock/interstock connection area; interstock/scion connection area; and areas with no connection or necrosis.

The data were subjected to analysis of variance, and the means were compared using the Scott-Knott test at the 5% probability level. Additionally, the correlations between tissue percentage and connection area for all materials were tested and considered significant when $R^2 \geq 0.60$. The analyses were performed in the System for Analysis of Variance - SISVAR programme (FERREIRA, 2011).

Results and Discussion

There was no significant interaction between the scions and interstocks used ($P > 0.05$), so the results will be presented separately for each factor. The *P. calleryana* rootstocks and *C. sinensis* rootstocks did not influence the percentage of regeneration area of the grafting

materials. Table 1 shows that there was no significant difference for rootstock area (%), interstock area (%), connection area (%), and necrosis (%).

Table 1. Percentage and contribution of the component tissues in the cellular connections of the *P. calleryana* and *C. sinensis* rootstocks at the rootstock/interstock region in Packham's Triumph pear double grafting.

Variables (%)*	<i>P. calleryana</i>	<i>C. sinensis</i>	CV (%)
Rootstock area	80.61a	76.28a	9.64
Interstock area	15.32a	16.49a	12.14
Connection area	1.26a	1.50a	23.22
Necrosis area	2.38a	2.82a	21.95
Parenchyma rays area	10.98a	10.17a	16.59
Xylem - xylem	5.32a	4.93a	30.18
Phloem - phloem	32.47a	34.61a	22.21
Phloem - cortex	14.08a	14.89a	23.05
Cortex - cortex	48.11a	45.55a	17.34

* Means followed by the same lowercase letter in the row do not differ significantly, as determined by the Scott-Knott test at the 5% probability level.

Source: From the author (2019).

These results show that the grafting technique was well executed since the percentages of rootstock and interstock areas are the same for both rootstocks (Table 1). This indicates that the grafting technique followed the same standard for both treatments. We also observed similar regeneration areas and contributions from each tissue involved in the process (Table 1) between the materials tested. According to Ermel et al. (1997), good tissue alignment during grafting can be a determining factor for cell connection and seedling development.

Cholid, Susanto and Purwoko (2014) studied different grafting methods and times in the physic nut (*Jatropha curcas* L.) and observed that the grafts between scions and rootstocks of the same age and with the same stem diameter promoted better tissue alignment. They concluded that the more similar in diameter and aligned the rootstock and scion are, the greater the chance of grafting success.

Cells must maintain contact to enable symplastic transfer of water and nutrients; thus, it is thought that grafting success is more likely when the materials are more aligned during grafting. With greater alignment, tissues responsible for cell regeneration have a greater chance of being paired, facilitating communication between the rootstock and scion.

There were no differences in the contributions of the cortex, phloem, and xylem to cell regeneration between the *P. calleryana* and *C. sinensis* rootstocks (Table 1). This is interesting because it demonstrates that during cell regeneration, cell connections are not

established equally by all tissues regardless of the species. In fact, there are tissues that contribute more to regeneration. This result corroborates the hypothesis that some tissues have greater relevance and contributions to cell connections and perform more important functions for grafting. Table 1 shows that the region composed of the cortex and phloem together represents more than 90% of the connection area for both rootstocks, suggesting that they are responsible for grafting success. This finding is also demonstrated in Figures 1 and 2. For example, Figure 1a clearly shows the contribution of the cortex and phloem to regeneration, as the junction between the rootstock and interstock in the xylem region is much lower.

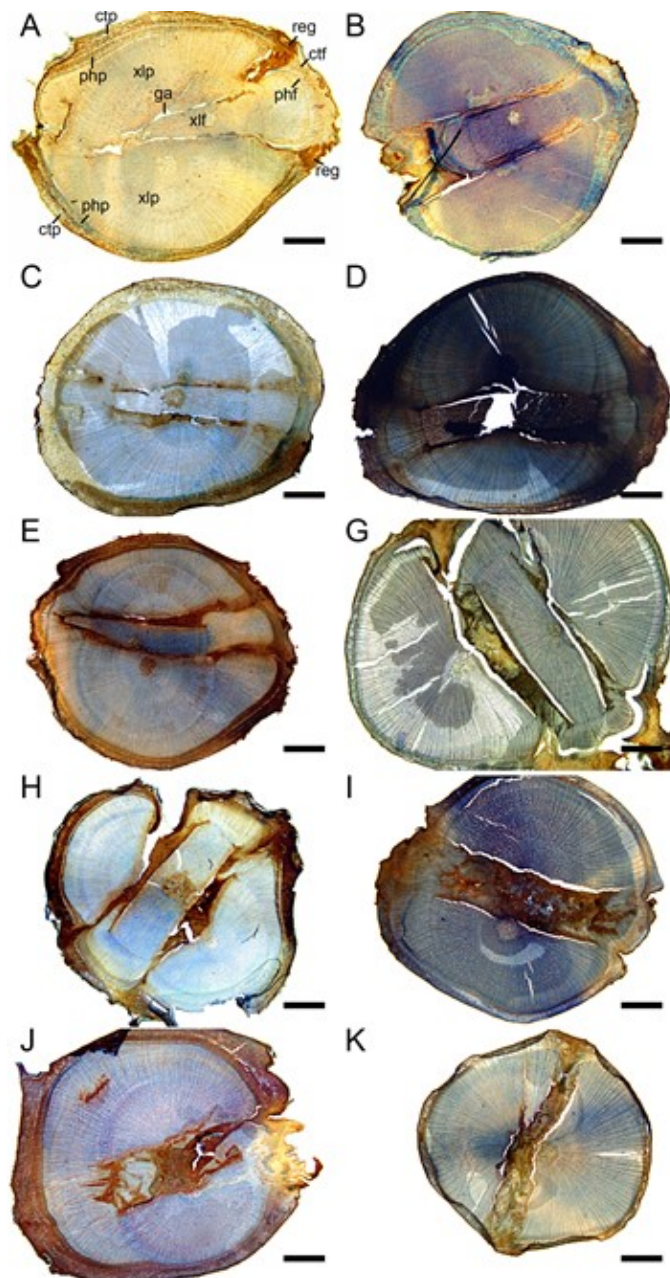


Figure 1. Cross sections of the connection region between the rootstock and interstock used in *P. communis* grafting. *P. calleryana* rootstock (A, C, E, H and J); *C. sinensis* rootstock (B, D, F, I and K). rct = rootstock cortex, ict = interstock cortex, rph = rootstock phloem, iph = interstock phloem, rxl = rootstock xylem, ixl = interstock xylem, reg = regeneration region, gap = region lacking reconnection. Scale bars = 1.5 mm.

Source: From the author (2019).

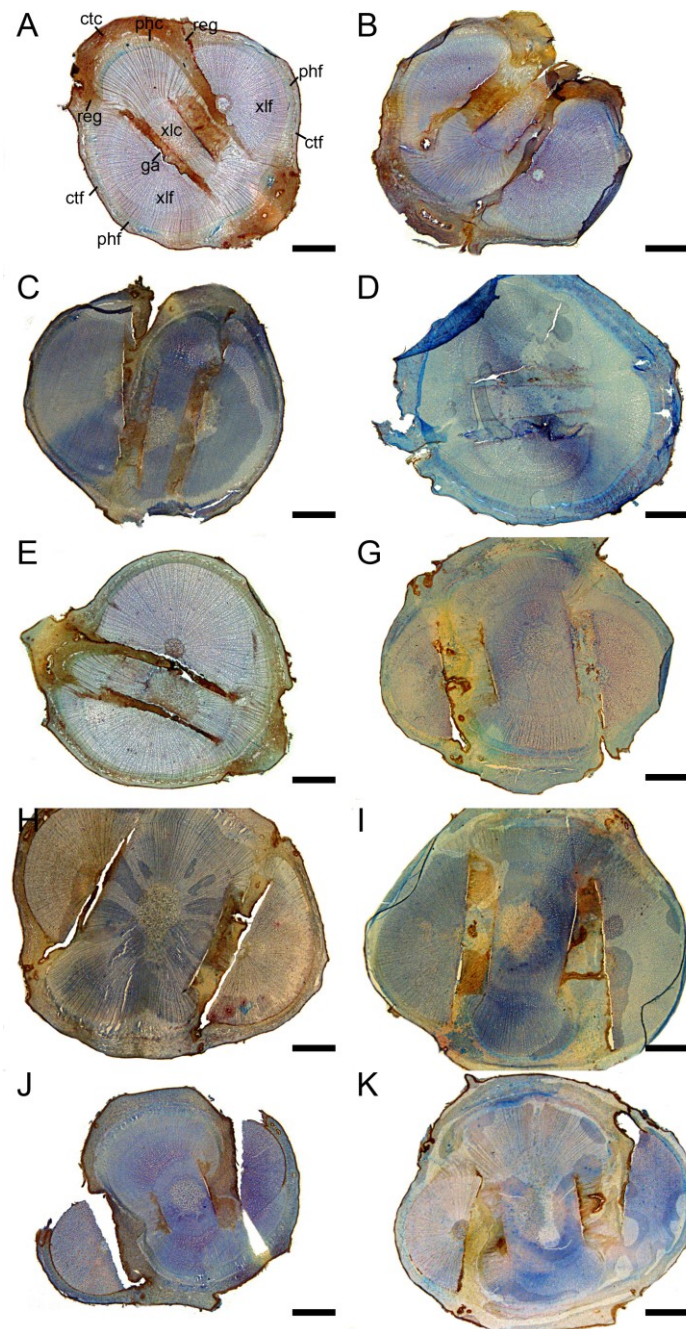


Figure 2. Cross sections of the connection region between the interstock and crown used in *P. communis* grafting. *P. calleryana* rootstock (A, C, E, H and J); *C. sinensis* rootstock (B, D, F, I and K). ict = interstock cortex, cct = crown cortex, iph = interstock phloem, cph = crown phloem, ixl = interstock xylem, cxl = crown xylem, reg = regeneration region, gap = region lacking reconnection. Scale bars = 1.5 mm.

Source: From the author (2019).

There was a difference in the area of the interstocks between the treatments (Table 2). However, reinforcing the rootstock trend, there was no variation in the percentage contribution of the connection areas between the tissues (Table 2). The Adams interstock (Table 2) had a smaller area relative to the other interstocks and a smaller rootstock connection area (Figure 1j and k). These characteristics may be directly related to the smaller area of the tissues responsible for the connection, which leads to a reduction in the cell regeneration area.

Table 2. Percentage and contribution of tissues in the cellular connections of the EMA, BA-29, EMC, Sydo and Adams interstocks in the rootstock/interstock region in Packham's Triumph pear double grafting.

Variables (%)*	EMA	BA-29	EMC	Sydo	Adams	CV (%)
Rootstock area	74.86a	75.92a	77.44a	80.52a	83.48a	9.64
Interstock area	20.44a	12.70c	17.07b	15.91b	13.41c	12.14
Connection area	1.67a	1.61a	1.31a	1.45a	0.86b	23.22
Necrosis area	3.01b	1.50c	4.15a	2.10c	2.24c	21.95
Parenchyma rays area	9.58a	10.55a	10.64a	10.62a	11.49a	16.59
Xylem - xylem	6.7a	6.24a	4.39a	2.25a	5.98a	30.18
Phloem - phloem	34.46a	25.86a	33.98a	39.27a	34.15a	22.21
Phloem - cortex	14.46b	23.12a	8.08b	16.32b	10.44b	23.05
Cortex - cortex	44.28a	44.77a	53.53a	42.15a	49.41a	17.34

* Means followed by the same lowercase letter in the row do not differ significantly, as determined by the Scott-Knott test at the 5% probability level.

Source: From the author (2019).

The Adams interstock exhibited a lower connection area in the two types of double graft combinations, i.e., rootstock/interstock and interstock/crown (Table 2 and 3). The Adams interstock also had a higher percentage of necrotic area in grafting of the upper region. This may have contributed to a smaller crown connection area. Since this material has more necrosis than the others, it also has a smaller connection area. This relationship is shown in Figures 1 and 2, in which we observed a large portion of the necrotic area in the contact area between the rootstock and interstock in all treatments. Thus, necrosis may be related to the unsuccessful joint cell regeneration between the grafting materials, preventing the transfer of water and nutrients from the rootstock to the interstock.

Table 3. Percentage and contribution of the tissues comprising the cellular connection of the EMA, BA-29, EMC, Sydo and Adams interstocks in the interstock/crown region in Packham's Triumph pear double grafting.

Variables (%)*	EMA	BA-29	EMC	Sydo	Adams	CV (%)
Interstock area	41.61c	63.02a	56.24b	54.61b	32.51d	8.53
Crown area	53.88b	34.03d	39.01c	41.72c	61.98a	8.79
Connection area	2.70b	2.17b	4.07a	2.01b	2.61b	26.90
Necrosis area	1.78b	0.75c	0.66c	1.64b	2.88a	27.09
Parenchyma rays area	12.80a	10.10a	13.81a	11.67a	12.23a	23.74
Xylem - xylem	4.78a	6.93a	8.10a	5.86a	8.01a	29.62
Phloem - phloem	31.77a	33.72a	32.54a	25.38a	31.97a	21.94
Phloem - cortex	17.15a	18.95a	15.83a	16.14a	16.21a	22.45
Cortex - cortex	46.28a	40.38a	43.51a	51.49a	43.79a	21.37

* Means followed by the same lowercase letter in the row do not differ significantly, as determined by the Scott-Knott test at the 5% probability level.

Source: From the author (2019).

Additionally, with regard to the behaviour of the interstocks at the interstock/crown region (Table 3), the data support the hypothesis that there is a lower incidence of necrosis where there is increased connection between the tissues, as observed for EMC (Figure 2a and b). As previously mentioned, this is because nearly all of the necrotic areas are in the region in which the scion and rootstock are close. Thus, the connection and necrotic processes occur in an antagonistic way; i.e., if there is a good connection between the rootstock and scion, there is no cell death between the tissues.

The first sign of response to injury caused by grafting is cell death in the incision region. However, this necrotic layer disappears over time when there is tissue compatibility (ASANTE; BARNET, 1997; MELNYK, 2016). The Adams cultivar characteristics agree with those proposed in the literature; in this cultivar, the callus proliferation between the grafting components failed to "absorb" the necrotic layer located between the materials, which resulted in a decreased connection area for this combination of cultivars.

Much of the necrotic tissue is located in the region responsible for connecting the components; when this contact is absent, there is less connection between the tissues and reduced differentiation into cambium cells, which are responsible for the subsequent formation of new vascular tissue to re-establish the connection. Cholid, Susanto and Purwoko (2014) studied physic nut grafting and demonstrated that the new vascular elements formed in the connection area between the scion and rootstock were compatible, and they observed many vessels and a smaller necrotic layer at the graft union. In the case of incompatible materials, the authors observed a larger necrotic layer and fewer vessels. These differences

may explain the discontinuous connections between the crown and rootstock and the blocked transport of water and nutrients to the crown.

The Adams cultivar had a larger necrotic area than those of the other cultivars in both grafting regions (Figure 1j, k, 2j and k); in the upper region, it had a smaller connection area than the other interstocks. This cultivar most likely had less callus proliferation than those of the others, resulting in a smaller area shared with the crown of the Packham's triumph pear; consequently, more necrotic cells were maintained. Further research on the mechanism of necrotic layer disappearance is necessary to clarify whether its retention is caused by reduced proliferation of undifferentiated cells and whether this layer is a barrier that limits the expansion of cells responsible for the connection between the grafting components.

The variability in cell regeneration during grafting between plant species and cultivars is related to their ability to produce callus and to later generate a vascular system (CHOLID; SUSANTO; PURWOKO, 2014). Therefore, it is essential to characterize the area of connection between the grafting components to distinguish the relevance of the component tissues of the rootstock and scion.

Figure 3 shows the correlations between the connections of the different cell regeneration component tissues and the total connection area of the materials in the rootstock/interstock and interstock/crown region. The behaviour of the tissues is similar for both the rootstock/interstock and interstock/crown combinations. Based on this finding, we believe that cell regeneration and connection display this behavioural pattern in all grafting processes. The different components had distinct contributions to cell propagation.

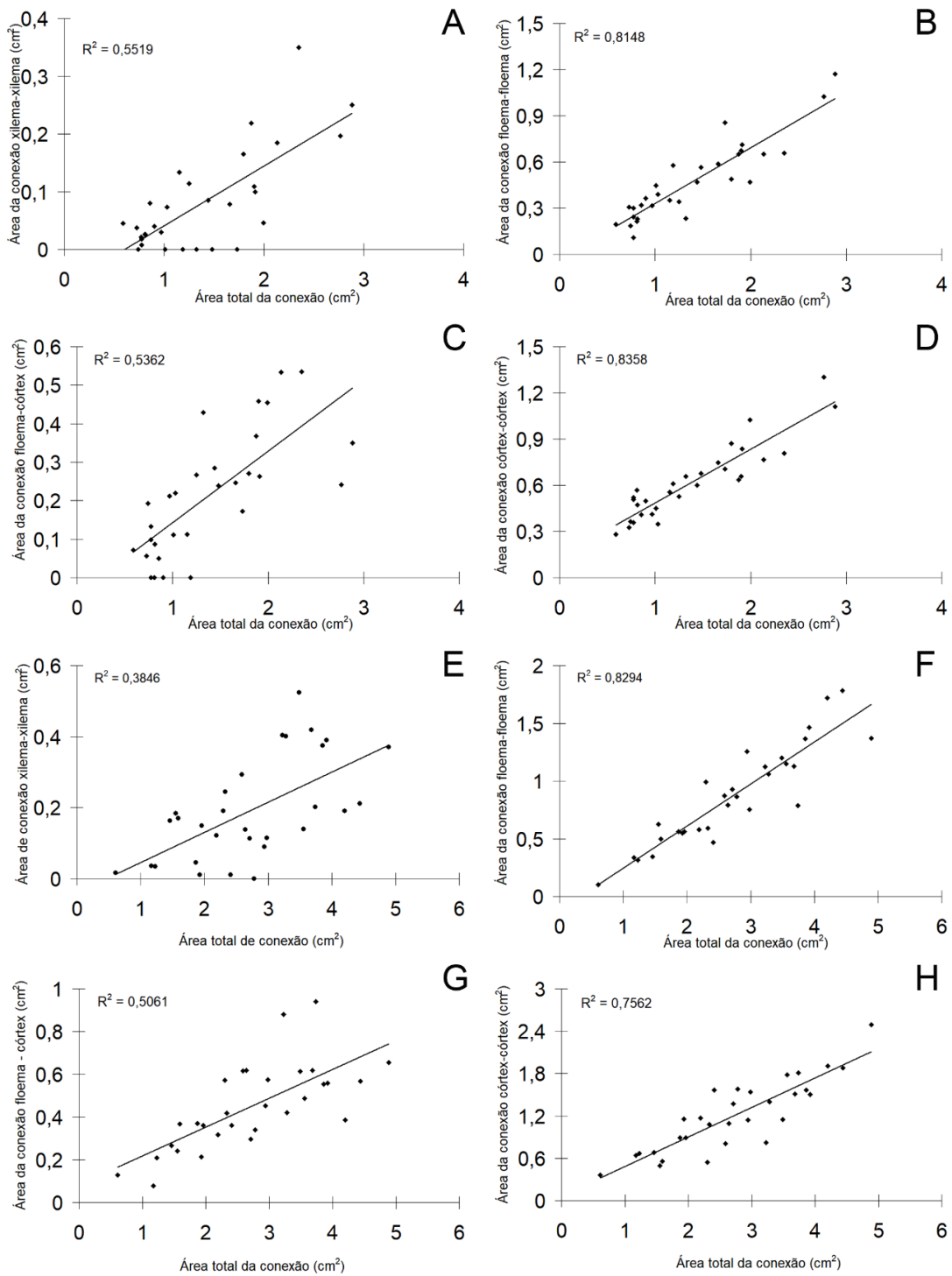


Figure 3. Correlation between the interactions of the different component tissues of cell connection and the total connection area of the materials in the rootstock/interstock (A-D) and interstock/crown (E-H) regions in pear trees.

Source: From the author (2019).

The xylem showed a correlation lower than 0.6 in both combinations (Figures 3a and e), and it was only 0.38 for the interstock/crown combination. This outcome demonstrates that the xylem insignificantly contributes to the cell connection process. Xylem cells, except xylem parenchyma cells, do not de-differentiate and contribute to cell regeneration; thus, the xylem is not critical for this stage of grafting because the fibres, vessel elements and sclereids are dead (BARNETT; WEATHERHEAD, 1988; FAN et al., 2015). By contrast, the cortex and phloem (Figure 2b, 2d, f and h) are significantly correlated with the total connection area in both regions, surpassing 80% correlations in most cases. Therefore, these tissues are directly responsible for the cell regeneration and connection between the grafting materials. As the cortex cells are a critical parenchyma and most phloem cells except for the sclerenchyma are alive (COPEL, 1969; DOLGUN, 2008; FAN et al., 2015), it is understandable that these stem regions are more relevant in regeneration and grafting.

The phloem-cortex combination was not highly correlated with the total connection area (Figure 2c and g). This outcome occurred most likely because there is no direct contact between the phloem-cortex cells or cortex-phloem between the materials involved in the propagation process when there is good alignment between these materials. If they were arranged in a way that they are paired, this parameter would probably contribute more significantly to the total connection area because when they are evaluated separately, the phloem and cortex have high correlations with the connection area.

One assumption in the selection of rootstocks and scions for higher compatibility is that they are able to establish cellular contact near the graft union to maintain water and nutrient flow between graft components (DARIKOVA et al., 2011). Therefore, it is essential to evaluate the contribution of different tissues to cell connection and regeneration. Additionally, when the tissues relevant for grafting are identified, it is possible to pre-select more promising materials based on their anatomical characteristics. There will be a fusion between plant parts derived from the contact between the rootstock and scion to establish vascular continuity. In this context, the contact between the cells is constituted by plasmodesmata; this results in a symplastic connection that allows mutual metabolic interactions between both parts, which will support the subsequent differentiation of the cambium and vascular tissues (PINA; ERREA, 2005).

Importantly, the absence of cellular connection, which may result in incompatibility, can have consequences such as poor vascular connection, vascular discontinuity, and even phloem degeneration in the graft area, which can be detected early in the weeks following

grafting (PINA et al., 2009). This outcome results in poor water and nutrient transport by the xylem and poor photoassimilate transport by the phloem.

Table 4 shows the superiority of the *P. calleryana* rootstock compared to *C. sinensis* for the percentage of sprouted grafts. It is paramount to quantify which tissues influence the differences between rootstocks and how because we expect that such superiority comes from anatomical characteristics of *P. calleryana*. The percentages of cortex, phloem, and xylem were thus evaluated for both the rootstock/interstock combination and the interstock/crown combination to determine the cause of this difference during grafting.

Table 4. Percentage of sprouted grafts in Packham's Triumph pear double grafted onto the EMA, BA-29, EMC, Sydo, and Adams interstocks and in the *P. calleryana* and *C. sinensis* rootstocks 150 days after grafting.

		Percentage of sprouted grafts *
Rootstocks	<i>P. calleryana</i>	87.0a
	<i>C. sinensis</i>	80.0b
Interstock	EMA	92.5a
	BA-29	81.3a
	EMC	85.0a
	Sydo	77.5a
	Adams	81.3a
CV (%) 12.27		

* Means followed by the same lowercase letter in the column do not differ significantly, as determined by the Scott-Knott test at the 5% probability level.

Source: From the author (2019).

According to Cholid, Susanto and Purwoko (2014), the main causes of graft incompatibility include physiological and biochemical factors, cellular and tissue changes at the graft union, and cellular recognition between the grafting components. In the present study, anatomical characteristics related to cell recognition and cellular changes at the grafting site were observed and quantified to explain the differences in compatibility.

When evaluating the tissue percentages for the different rootstocks in the rootstock/interstock region (Table 5), we observed that the cortex area (%) was higher for the *P. calleryana* rootstock than the *C. sinensis* rootstalk. Table 5 also shows that the *C. sinensis* rootstock has a greater xylem composition. All other variables analysed did not differ significantly between the rootstocks. The graphs presented in Figure 3 show that the areas composed of the cortex-cortex and phloem-phloem combinations present high correlations with the total connection area.

Table 5. Anatomical components of the grafting region between rootstock and interstock for the *P. calleryana* and *C. sinensis* rootstocks in double grafting of Packham's triumph pear.

Variables (%)	<i>P. calleryana</i>	<i>C. sinensis</i>	CV (%)
Cortex - rootstock	16.62a	11.83b	16.20
Phloem - rootstock	9.54a	8.64a	18.73
Xylem - rootstock	73.84b	79.52a	3.74
Cortex - interstock	9.28a	8.61a	27.06
Phloem - interstock	5.87a	6.40a	29.03
Xylem - interstock	84.84a	84.98a	6.19

* Means followed by the same lowercase letter in the row do not differ significantly, as determined by the Scott-Knott test at the 5% probability level.

Source: From the author (2019).

In work by Pio et al. (2009) with the same rootstocks (*P. calleryana* and *C. sinensis*), a significant difference was not detected in the sprouting efficiency of *C. oblonga* quince trees onto these rootstocks. This difference may be related to factors intrinsic to the crown or to some anatomical characteristics of the quince trees used in that study. Although samples of the same species were used, they were from different cultivars. Importantly, the authors did not perform the double-grafting technique, but rather used only scion and rootstock. In turn, Melo et al. (2017) studied the anatomical characteristics of *P. communis* pear trees grafted onto both rootstocks used in the present study. They confirmed findings from previous studies that this cultivar has high anatomical compatibility with the *P. calleryana* rootstock and high incompatibility with the *C. sinensis* rootstock.

The evidence described above further supports the finding that the cortex is important in cell regeneration. The rootstock, which was composed of a larger cortex area, also exhibited greater grafting efficiency, which confirms the direct influence of this region in the propagation method. Another important finding was the higher percentage of xylem in the *C. sinensis* rootstock. This tissue had a very low correlation with the total connection area, which corroborates the inferior percentage of sprouted shoots observed for this rootstock.

In addition to the antagonistic contributions of the cortex and xylem to grafting propagation success, we found that the area of xylem parenchyma rays does not significantly contribute to better sprouting efficiency (Tables 1 and 2). The area of xylem parenchyma rays did not differ significantly between the *P. calleryana* and *C. sinensis* rootstocks or among the interstocks used in this study, and thus it does not contribute to cell connection and regeneration post-grafting. This was also reported by Melo et al. (2017) when they observed different performances among species in a study of grafting combinations between pear cultivars and two species of quince. When observing the parenchyma rays, which are located

in the xylem, the anatomical characteristics demonstrated that this tissue does not significantly contribute to the compatibility between the materials used.

With respect to the component proportions in the rootstock, there was only a difference for the Sydo interstock, which presented a smaller cortex area compared to the others, as shown in Table 6. This variation is probably due to its combinations with the *C. sinensis* rootstock (Figure 1g). The same pattern was obvious for the cortex area proportions for all the interstocks combined with the *C. sinensis* rootstock, but the differences were not significant. Out of the anatomical areas of the different interstocks, only the EMC cultivar presented a significant difference in the cortex percentage (Figures 1a and b).

Table 6. Anatomical components of grafting region between rootstock and interstock for EMA, BA-29, EMC, Sydo, and Adams interstocks in the double-grafting process of Packham's triumph pear.

Variables	EMA	BA-29	EMC	Sydo	Adams	CV (%)
Cortex - rootstock	15.67a	17.35a	14.57a	9.69b	13.82a	16.20
Phloem - rootstock	8.37a	10.22a	9.98a	7.89a	8.99a	18.73
Xylem - rootstock	75.96a	72.45a	75.44a	82.41a	77.18a	3.74
Cortex - interstock	8.49b	9.12b	13.29a	6.81b	7.05b	27.06
Phloem - interstock	7.24a	5.50a	7.69a	5.50a	4.76a	29.03
Xylem - interstock	84.27a	85.38a	79.03a	87.70a	88.18a	6.19

* Means followed by the same lowercase letter in the row do not differ significantly, as determined by the Scott-Knott test at the 5% probability level.

Source: From the author (2019).

Conclusions

The cortex and phloem tissues are primarily responsible for cell regeneration and connection in grafting. The *P. calleryana* rootstock has greater compatibility with the interstocks due to its higher proportion of cortex. The xylem parenchyma rays do not affect cell regeneration and connection. Species containing more cortex and phloem in the rootstock or scion will have greater potential for grafting success.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and *National Council for Scientific and Technological Development* – CNPq.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, E.; ALVARENGA, A. A.; SOUZA, M. de. A produção extrativa de um novo marmeleiro no Sul do Estado de Minas Gerais. **Revista Ciência e Prática**, Lavras, v. 16, p. 78, 1992.
- ASAHINA, M. et al. Spatially selective hormonal control of RAP2. 6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 38, p. 16128-16132, 2011.
- ASANTE, A. K.; BARNETT, J. R. Graft union formation in mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Horticultural Science**, London, v. 72, p. 781-790, 1997.
- BARBOSA, W. et al. Conservação e germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas da pereira porta-enxerto 'Taiwan Nashi-C'. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 54, p. 147-151, 1997.
- BARNETT, J. R.; WEATHERHEAD, I. Graft formation in Sitka spruce: a scanning electron microscope study. **Annals of Botany**, London, v. 61, p. 581-587, 1988.
- BETTIOL NETO, J. E. et al. Production and postharvest quality of pear tree cultivars in subtropical conditions at eastern of São Paulo state, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1740-1746, 2014.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Comércio Exterior. **Balança comercial brasileira**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/menu/index/id/7>>. Acesso em: 7 jan. 2017.
- CHOLID, M.; SUSANTO, S.; PURWOKO, B. S. Effects of grafting time and grafting methods used on scion and rootstock compatibility of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Asian Journal of Agricultural Research**, Deira, v. 8, n. 3, p. 150-163, 2014.
- COPEL, D. L. Graft union formation in Douglas-fir. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 56, p. 285-289, 1969.
- DARIKOVA, J. A. et al. Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock: a review. **Journal of Siberian Federal University**, Krasnoyarsk, v. 4, n. 1, p. 54-63, 2011.
- DOLGUN, O. A histological investigation on graft formation of some Nectarine cultivars grafted on pixy rootstock. **World Journal of Agricultural Sciences**, Deira, v. 4, p. 565-568, 2008.
- ERMEL, F. F. et al. Early Scion/Stock junction in compatible and incompatible Pear/Pear and Pear/Quince grafts: a histo-cytological study. **Annals of Botany**, London, v. 79, p. 505-515, 1997.
- ERREA, P.; FELIPE, A.; HERRERO, M. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 393-401, 1994.

EVERT, R. F. **Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function and development.** Hoboken: J. Wiley, 2006.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 109-120, 2011. Volume especial.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMAN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas.** Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005.

FAN, J. et al. The processes of graft union formation in tomato. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 5, p. 569-574, 2015.

FAORO, I. D. Peras comerciais para as regiões mais frias de Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 12, n. 2, p. 5-8, 1999.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FIORAVANÇO, J. C. A cultura da pereira no Brasil: situação econômica e entraves para o seu crescimento. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 52-60, 2007.

FONTANAZZA, G.; BALDONI, L. Propagazione e miglioramento genético. In: LALATTA, F. (Ed.). **Frutticoltura generale.** Rome: REDA, 1992. p. 127-280.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT: production-crops.** Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 8 maio 2018.

GARNER, R. J.; BRADLEY, S. **The Grafter's handbook: revised & updated edition.** Hachette: M. Beazley, 2017.

GOLDSCHMIDT, E. E. Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1-9, 2014.

HARRIS, J. M.; BARNETT, J. R. Differential callus nodules in resin pockets of *Pinus ponderosa* Laws. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, v. 5, p. 226-229, 1975.

HARTMANN, H. T. **Plant propagation: principles and practices.** New Jersey: Prentice Hall, 2010. 915 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal - PAM.** Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 7 jan. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal - PAM.** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 8 maio 2018.

JANICK, J. **A ciência da horticultura**. Rio de Janeiro: USAID, 1966.

JEFREE, C. E.; YEOMAN, M. M. Development of intercellular connections between opposing cell in graft union. **New phytologist**, Cambridge, v. 93, p. 491-509, 1983.

JOHNSON, S. J.; KREIDER, S.; MILES, C. A. **Vegetable grafting eggplants and tomatoes**. Washington: Washington State University, 2011.

LAPINS, K. Some symptoms of stock-scion incompatibility of apricot varieties on peach seedling rootstock. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 39, p. 194-203, 1959.

MAHUNU, G. K. et al. Anatomical studies of graft formation in cashew (*Anacardium Occidentale* L.). **Agricultural and Biology Journal of North America**, Milford, v. 3, p. 150-153, 2012.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C. et al. Physiological aspects of rootstock-scion interactions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 112-118, Dec. 2010.

MASSERON, A. **Les porte-greffe pommier, poirier et nashi**. Paris: Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, 1989.

MCCULLY, M. E. Structural aspects of graft development. In: MOORE, R. (Ed.). **Vegetative compatibility responses in plants**. Texas: Baylor University Press, 1983. p. 71-88.

MELNYK, C. W. Plant grafting: insights into tissue regeneration. **Regeneration**, Oxford, v. 4, p. 3-14, 2016.

MELNYK, C. W. et al. A developmental framework for graft formation and vascular reconnection in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, London, v. 25, n. 10, p. 1306-1318, 2015.

MELO, E. T. et al. Anatomic compatibility of pear and quince trees grafted on *Pyrus calleryana* and *Chaenomeles sinensis* rootstocks. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 52, n. 10, p. 877-886, out. 2017.

MERGEN, F. Anatomical study of slash pine graft unions. **Quarterly Journal of the Florida Academy of Science**, New York, v. 17, p. 237-245, 1954.

MOORE, R. Graft incompatibility between pear and quince: the influence of metabolites of *Cidonia oblonga* on suspension cultures of a *Pyrus communis*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 73, n. 1, p. 1-4, 1986.

MOSSE, B. Further observations on growth and union structure of double-grafted pear on quince. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 33, p. 186-193, 1958.

MOSSE, B. Graft incompatibility in fruit trees with particular reference to its underlying causes. **Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops**, East Mailing, v. 28, p. 36, 1962.

- NAKASU, B. H.; LEITE, D. L. Indicação de porta-enxertos e cultivares de pereira para o sul do Brasil. **Hortisul**, Pelotas, v. 1, n. 2, p. 20-24, 1990.
- NOEL, A. R. A. Callus formation and differentiation at an exposed cambial surface. **Annals of Botany**, London, v. 32, p. 347-359, 1968.
- PEREIRA, I. S. et al. Incompatibilidade de enxertia em *Prunus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 9, p. 1519-1526, 2014.
- PINA, A. et al. Cell-to-cell transport through plasmodesmata in tree callus cultures. **Tree Physiology**, Oxford, v. 29, p. 809-818, 2009.
- PINA, A.; ERREA, P. A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 1-11, Aug. 2005.
- PINA, A.; ERREA, P.; MARTENS, H. J. Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of *Prunus* spp. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 143, p. 144-150, 2012.
- PIO, R. et al. Intergeneric grafting of pear cultivars in the 'Japonês' quince tree. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 800, p. 707-712, 2008.
- PIO, R. et al. Marmeleiro 'Japones': uma nova opção de porta enxerto para marmelos. **O Agrônomo**, Campinas, v. 57, p. 15-16, 2005.
- PIO, R. et al. Potencial de propagação de cultivares de marmeleiro por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, p. 287-289, 2004.
- PIO, R. et al. Propagação do marmeleiro 'Japonês' por estaquia e alporquia realizadas em diferentes épocas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 570-574, mar./abr. 2007.
- PIO, R. et al. Teste de porta-enxertos intergenéricos para marmeleiros em condições de viveiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 521-526, mar./abr. 2009.
- RAMOS, J. D.; SOUZA, M.; PASQUAL, M. Porta-enxertos para pereira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 12, p. 1817-1820, dez. 1990.
- RIBEIRO, L. M. et al. Histological study of micrografting in passionfruit. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 123, p. 173-181, 2015.
- SEIFERT, K. E. et al. Mudanças de pera produzidas por dupla enxertia em marmeleiro utilizando o porta-enxerto 'Japonês'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 12, p. 1631-1635, dez. 2009.
- STODDARD, F. L.; MCCULLY, M. E. Histology of the development of the graft union in pea roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, p. 1486-1501, 1979.
- WANG, J. L. J.; RONGLING, W. Plant grafting: how genetic exchange promotes vascular reconnection. **New Phytologist**, Cambridge, v. 214, n. 1, p. 56-65, 2017.

WANG, Y. Q. Plant grafting and its application in biological research. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 56, p. 3511-3517, 2011.

YASSIN, H. M.; HUSSEN, S. M. Reiview on role of grafting on yield and quality of selected fruit vegetables. **Global Journal of Science Frontier Research: D Agriculture and Veterinary**, Framingham, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2015.

YEOMAN, M. M. et al. Cellular interactions during graft formation in plants, a recognition phenomenon? **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 32, p. 139-160, 1978.

YIN, H. Graft-union development: a delicate process that involves cell-cell communication between scion and stock for local auxin accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 4219-4232, 2012.

YONEMOTO, Y. et al. Effects of rootstock and crop load on sap flow rate in branches of 'Shirakawa Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 295-300, Nov. 2004.

ZARROUK, O. et al. Changes in cell/tissue organization and peroxidase activity as markers for early detection of graft incompatibility in peach/plum combinations. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 135, n. 1, p. 9-17, 2010.

ZUCARELLI, V. **Aspectos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos da enxerta de maracujazeiros sobre *Passiflora cincinnata* Mast.** 2011. 104 f. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2011.