



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento de Fitotecnia

**Multiplicação *in vitro* de Cultivares e Porta-
Enxertos de Nogueira (*Juglans regia* L.);
Estudo das Fases de Enraizamento e
Climatização**

Rui Miguel Da Natividade Vicente Carlos

Orientação: Professor Augusto António Vieira Peixe

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento de Fitotecnia

**Multiplicação *in vitro* de Cultivares e Porta-
Enxertos de Nogueira (*Juglans regia* L.);
Estudo das Fases de Enraizamento e
Climatização**

Rui Miguel Da Natividade Vicente Carlos

Orientação: Professor Augusto António Vieira Peixe

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2014

'O homem quer a obra nasce.'

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que sempre estiveram do meu lado e a todos aqueles negativamente ou positivamente contribuíram para a minha construção '*Somos um conjunto de pessoas*'. Levarei para sempre comigo um sentimento de gratidão: - Aos meus Pais e irmãos, a Mariline, ao meu orientador e a Virgínia Sobral, ao meus antigos professores, agora amigos, Augusto Candeias (isso não é pêscoço) e Vasco Ferreira (pelas suas aulas de Matemática e pelas nossas voltas BTT) e grato principalmente ao meu Mestre (Murta), que muito me têm ensinado, tentando sempre construir-me como um ser melhor.

Por fim um agradecimento ao projeto PRODER Medida 4.1 Operação-12400, pelo apoio financeiro, sem o qual a realização destes ensaios não teria sido possível.

Resumo

Pretendeu-se com este trabalho contribuir para a otimização das fases de enraizamento *in vitro* e climatização de plantas de *Juglans sp.* Os ensaios realizados focaram especialmente a climatização do porta-enxerto híbrido ‘Paradox’ (*Juglans regia* x *Juglans hindssi*) clone ‘Vlach’ e o enraizamento *in vitro* da cultivar ‘Chandler’. Em relação ao híbrido ‘Paradox’, o testou-se a utilização de vários substratos de expressão radical, utilizaram-se cubos de lã de rocha, Jiffy Preformas®, pastilhas de turfa prensada e vermiculite humedecida, funcionando esta última como controlo. Os melhores resultados, com 78% de enraizamento e 75% de sucesso na aclimatização, foram conseguidos com o substrato Jiffy Preformas®.

Nos ensaios de enraizamento da cultivar ‘Chandler’ foram testadas diferentes concentrações de auxina (AIB) (3, 5; 10 e 15 mgL⁻¹) e diferentes tempos de contacto (5, 7, 9, 10 e 12 dias). A concentração de 15 mgL⁻¹ de AIB durante 9 dias foi a que conduziu aos melhores resultados, com uma taxa média de enraizamento de 85%.

Palavras-chave: ‘Chandler’, Cultura *in vitro*, Enraizamento adventício, *Juglans*, Micropropagação, ‘Paradox’,

***In Vitro* Multiplication of Cultivars and Rootstocks of Walnut (*Juglans regia* L.);
Study of Phases Rooting and Acclimatization.**

Abstract

This work aimed on contributing to optimize the phases of *in vitro* rooting and acclimatization in *Juglans* species. The trials especially focused on the acclimatization of the hybrid rootstock 'Paradox' (*Juglans regia* x *Juglans hindssi*), clone 'Vlach', and on the *in vitro* rooting of the 'Chandler' cultivar. Concerning the hybrid 'Paradox', several substrates for root expression were tested (rockwool cubes, Jiffy Preformas®, peat pressed pellets and moistened vermiculite). Moistened vermiculite was used as control. The best results, with 78% of rooting and 75% of success rate in acclimatization, were achieved with the substrate Jiffy Preformas ®. For the rooting trials on the cultivar 'Chandler', auxin (IBA) concentrations (3, 5, 10 and 15 mgL⁻¹) and contact times (5, 7, 9, 10 e 12 days) were tested. The concentration of 15 mgL⁻¹ during 9 days, with an average rate of rooting of 85%, led to the best results.

Keywords: Adventitious rooting, 'Chandler', *in vitro* culture, *Juglans*, Micropropagation, 'Paradox'

Índice	
Resumo	III
Abstract.....	IV
Índice de figuras	VIII
Índice de tabelas	IX
1. Introdução e Objetivos do Estudo	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Origem, Classificação e Características Gerais da <i>Juglans regia</i> sp.....	3
2.2. Os Híbridos ‘Paradox’	4
2.3. Técnicas de propagação em <i>Juglans</i> sp.	5
2.3.1. Propagação por via seminal.....	5
2.3.2. Propagação por enxertia	6
2.3.2.1. Enxertias de gomo	6
2.3.2.2. Enxertia de garfo.....	8
2.3.3. Propagação por estacaria.....	11
2.3.4. Micropropagação.....	12
2.3.4.1. Descrição geral e Potencialidades da técnica.....	12
2.3.4.2 Fases do processo de micropropagação	13
2.3.4.2.1. Escolha do explante inicial e colocação em cultura asséptica	13
2.3.4.2.2. Fase de Multiplicação	15
2.3.4.2.3. Fase de Enraizamento	18
2.3.4.2.3.1. Alguns Fatores com Influência na Subfase de Indução Radical.....	19
2.3.4.2.3.1.1. O Genótipo	19
2.3.4.2.3.1.2. A Composição Mineral dos Meios	19
2.3.4.2.3.1.3. Os Hidratos de Carbono	21
2.3.4.2.3.1.4. Os Reguladores de Crescimento.....	22
2.3.4.2.3.2. Subfase de Expressão Radical	22
2.3.4.2.4. Aclimatização	25

3. Material e Métodos	26
3.1. Material vegetal	26
3.1.1. Materiais e procedimentos relativos ao processo de cultura <i>in vitro</i>	26
3.2. Condições de cultura	27
3.2.1. Meios de cultura <i>in vitro</i> e repicagens	27
3.2.1.1. Substratos e procedimentos de enraizamento e aclimatização	28
3.2.2. Condicionamento ambiental.....	29
3.3. Delineamento experimental e análise de dados	29
4. Resultados e Discussão.....	31
4.1 Ensaio 1: Otimização das condições de expressão radical e aclimatização do porta-enxerto ‘Vlach’	31
4.2. Ensaio 2: Otimização do processo de indução radical na cultivar ‘Chandler’	35
5. Conclusões.....	37
6. Bibliografia.....	39

Lista de Abreviaturas

FeEDDHA- Acetato de etilenodiamina di-2-hidroxifenil férrico

BAP- 6-Benzilaminopurina

DKW- Driver e Kuniyuki (1984)

FAO- Food and Agriculture Organization

AIB- Ácido-indol-3-butírico

ANA- Ácido 1-naftalenacético

MS-Murashige e Skoog (1962)

PPM- Plant Preservative Mixture

WPM-Woody Plant Medium

Índice de figuras

Figura 1. Influência da temperatura na formação do calo em noqueira.....	9
Figura 2. Tubo de calor na zona de enxertia.....	10
Figura 3. Taxas de multiplicação <i>in vitro</i> usando material adulto (‘Serr’ e MBT-T-231) e jovem (SBE 4, SBE 5, SBE 11, SBE 15, SBE21, SBE22, SBE 26, SBE 27) de clones de <i>Juglans regia</i> , após 5 a 15 repicagens em meio de multiplicação.....	20
Figura 4. Efeito da concentração de sacarose no meio de expressão no A) N° de raízes secundárias por raiz, e B) na percentagem de plantas aclimatizadas de <i>Juglans regia</i> cv. ‘Serr’.....	21
Figura 5. a) Explantes no final de 30 dias; b) Explantes após a repicagem.....	26
Figura 6. Fase de expressão radicular com os quatro tratamentos. 1- Jiffy Preformas®; 2- Pastilhas de turfa; 3- Cubos de lã de rocha e 4- Vermiculite humedecida nº2.....	28
Figura 7. Taxa de enraizamento (%) com a utilização dos quatro tratamentos.....	33
Figura 8. Enraizamento dos explantes, ao fim de 30 dias. (A) Enraizamento em alvéolos de lã de rocha, (B) alvéolos de turfa presada, (C) jiffy preformas® (D) a clássica vermiculite humedecida.....	33
Figura 9. Taxa de sobrevivência com a utilização de glomus nos quatro tratamentos.....	34
Figura 10. Planta com 30 dias após a transferência para a fase de climatização.....	34
Figura 11. Otimização do processo de indução radical cultivar ‘Chandler’, utilização de quatro concentrações diferentes de AIB durante 7 dias.....	35
Figura 12. Utilização de 10mgL ⁻¹ e 15mgL ⁻¹ de AIB testando 5 tempos de indução diferentes.....	36

Índice de tabelas

Tabela 1. Área plantada e produções de nozeiras por Portugal continental.....	1
Tabela 2. Balança comercial Portuguesa para a noz com casca.....	2
Tabela 3. Avaliação de porta-enxerto clonais de 'Paradox' relativamente ao vigor, resistência a nematodes e outras patologias.....	5
Tabela 4. Influência do vigor da planta mãe em vários parâmetros relacionados com a fase de enraizamento <i>in vitro</i>	19
Tabela 5. Efeito da variação da duração do pré-tratamento no escuro, 3 e 6 dias, em dois clones de <i>Juglans regia</i>	22
Tabela 6. Efeito da granulometria da vermiculite (tipo I e II) no enraizamento de clones de <i>J.regia</i> P ₃ e P ₇ , no meio DKW (1/4 dos macronutrientes) sem hormonas.....	23
Tabela 7. Influência do genótipo e do tipo de substrato, na percentagem de enraizamento, no nº de raízes primárias e secundárias, após 30 dias em cultura num meio de desenvolvimento da raiz.....	24

1. Introdução e Objetivos do Estudo

Os dados do recenseamento Agrícola de 2009 elaborado pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) referem a existência de cerca de 115.150 hectares de pomares de frutos de casca rija em Portugal. Destes, 2.436 hectares são de noqueiras, o que equivale a 2% de todos os frutos desta categoria (INE, 2011).

Do recenseamento de 2009 para o de 2013 houve um pequeno aumento da área em cerca de 397 hectares. Esta é uma cultura que, como pode ver-se na tabela 1, se distribui por todo o território continental Português, mas que predomina no norte, com as árvores exploradas em regime florestal para a produção mista de fruto e madeira e no Alentejo, onde as plantações se destinam essencialmente à produção de fruto, surgindo em pomares modernos, com uma forte componente de mecanização.

Tabela 1. Área plantada e produções de noqueiras por Portugal continental (Fonte: INE., 2013).

Regiões	Área (ha)	Produção (ton.)
Continente	2 909	4588
Norte	1 451	1319
Centro	587	833
Lisboa	22	35
Alentejo	733	2124
Algarve	116	277

A produção de noz a nível mundial esta distribuída pela Ásia (52 %), América (23 %) e Europa (20 %). Nos países da Comunidade Europeia (C.E) encontra-se cerca de 11,2 % da área mundial de pomares de noqueira, equivalente a cerca de 10,9 % da produção, sendo a produção unitária de aproximadamente 2,42 ton. ha⁻¹.

Na campanha de 2012/2013 a produção de noqueiras no continente foi de 15958 árvores e foram importadas 2278 árvores (INE, 2013).

O mercado mundial de noz é dominado pelos Estado Unidos (USA) e pela China. Estes dois países são responsáveis por mais de 75% da produção Mundial. Os Estados Unidos são os maiores exportadores, comercializam cerca de um terço da noz produzida a nível mundial. A produção nos USA situa-se predominantemente na Califórnia, que em 2012

produziu 470 mil toneladas, com uma subida de 2% em relação ao ano anterior (ERS, 2013, citado por Huntrods, 2013).

A balança comercial portuguesa está desequilibrada para este produto já que os valores das exportações são bastante inferiores aos das importações, como pode verificar-se pelos dados apresentados na tabela 2 (INE, 2013).

Tabela 2. Balança comercial Portuguesa para a noz com casca (Fonte: INE, 2013).

Entradas			Saídas		
Origem	Toneladas (ton.)	1.000Euros (€)	Origem	Toneladas (ton.)	1.000Euros (€)
Espanha	243.1	553.2	Angola	13	41.3
França	382.6	629.9	Espanha	21.6	54.6
Chile	295.5	545.4	Outros	3.2	9.8
EUA	37.5	63.1			
China	0.5	1.3			
Alemanha	74.3	131.4			
Total	1.033,50	2.924.30	Total	37.8	105,70

Não é aceitável que a balança comercial se mantenha nesta situação, porque a excelência da qualidade da noz nacional vai além-fronteiras, fazendo com que haja uma crescente procura externa, levando a que o mercado nacional tenha de adaptar-se a essa procura. Para isso tem que haver um aumento da área plantada e uma melhoria da produção unitária, passando esta última, entre outros aspetos, pela utilização de material vegetal de qualidade, tanto ao nível do porta-enxerto, como das cultivares.

Devido à grande dificuldade de propagação da nogueira, por estacaria, tanto das cultivares como dos porta-enxertos, a maior parte dos pomares é ainda instalada com recurso a porta-enxertos de origem seminal, sobre os quais, ainda no viveiro, ou já no local definitivo, é efetuada a enxertia. Isto conduz a pomares heterogéneos, tornando difícil uniformizar técnicas culturais, como a colheita, a poda, ou os tratamentos fitossanitários.

A obtenção de porta-enxertos clonais, assim como a possibilidade de auto-enraizar cultivares de *Juglans regia*, são aspetos de extrema importância e é sobre eles que incide o presente trabalho. O mesmo surge na sequência dos ensaios que, desde 2011,

vêm a ser desenvolvidos no âmbito do projeto PRODER Medida 4.1 Operação-12400. Até agora foi possível instalar em condições de assepsia o porta-enxerto ‘Paradox’, clone ‘Vlach’ e a cultivar ‘Chandler’. Está otimizada para ambos, a fase de multiplicação *in vitro*, foram também conseguidos resultados animadores nas fases de indução e expressão radical (Lopes, 2011). Com o presente estudo procura-se por um lado, otimizar o enraizamento e a aclimatização do ‘Vlach’ e, por outro, conseguir o enraizamento da cultivar ‘Chandler’.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Origem, Classificação e Características Gerais da *Juglans regia* sp.

O centro de origem da *Juglans regia*.L situa-se na Ásia Central, onde estas plantas crescem de forma selvagem. Na pré-história espalhou-se pelo Oeste da China, Cáucaso, Pérsia e Europa. Não existindo muitos vestígios arqueológicos na Europa devido às glaciações, fósseis de *Juglans regia*.L com 17.000 anos foram ainda assim encontrados no sul de França (Smith, s.d).

É uma fruteira caducifólia de clima temperado, que necessita de um período de vernalização para quebra da endodormência e temperaturas amenas para quebra de ecodormência e início do ciclo vegetativo anual. Se estas condições não forem conseguidas o desenvolvimento vegetativo e a produção de órgãos florais fica fortemente comprometida. Infelizmente são escassos os trabalhos levados a cabo sobre estes aspetos de grande importância para a cultura. (Chandler et al., 1937, citado por Aslamarz et al., 2009), referiram valores relativos ao número de horas de frio abaixo de 7°C que variam entre as 400 e as 1.500 horas, dependendo das cultivares. Num trabalho mais recente, (Aslamarz et al., 2009) verificam que há cultivares que necessitam de um maior número de horas de frio que outras. Testaram três cultivares ‘Serr’, ‘Pedro’ e ‘Lara’ e verificam que a cultivar ‘Serr’ necessita 650 horas de frio, a cultivar ‘Lara’ necessita de 750 a 900 horas de frio enquanto, que a cultivar ‘Harley’ só completou a sua dormência quando acumuladas 1000 horas de frio.

Crescendo naturalmente em locais frescos e margens de cursos de água, em altitudes até 700 m, a noqueira é uma árvore de grandes dimensões quando cresce sem intervenção humana, com um porte que pode atingir os de 30 m de altura. Apresenta ramos grossos,

com medula escalariforme e cicatrizes foliares numerosas. Os gomos são sésseis, com 2-4 catáfilos e as folhas apresentam-se compostas, com 3-25 folíolos, sésseis ou subsésseis, e assimétricos na base. O fruto é uma drupa, com uma dimensão entre os 4-6 cm, subgloboso, com casca verde, lisa e opaca. Ao secar torna-se necrótico e desprende do ramo (Franco, 1971). O endocarpo do fruto das variedades comerciais é rugoso com 4 lóculos na base e a semente no seu interior é cerebriforme (Navarro, 2009, citado por Ciudad, 2014).

É uma espécie diploide ($2n=32$), monoica, uma vez que possui flores masculinas e femininas na mesma planta e não apresenta problemas de incompatibilidade pólen/pistilo, ainda que a auto-polinização seja insuficiente para assegurar uma boa produção de fruto, devido ao facto de flores masculinas e femininas apresentarem diferentes tempos de maturação sexual (dicogamia) (Franco, 1971).

A classificação taxonómica da espécie, segundo Payghamzadeh e Kazemitabar, (2011), é a seguinte:

Reino: *Plantae*
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordem: *Fagales*
Família: Juglandaceae
Género: *Juglans*
Espécie: *J.regia*

Estes autores referem a existência de 20 espécies dentro do género *Juglans*, sendo três delas com especial importância económica; - *Juglans regia* L. com forte aptidão para a produção de frutos (pode ser utilizada na produção de madeira); - *Juglans nigra* L. e *Juglans cinerea* L., vocacionadas para a produção de madeira.

2.2. Os Híbridos ‘Paradox’

Os híbridos entre várias espécies de noqueira negra e noqueira pérsica (*J. regia*) são conhecidos com a designação de ‘Paradox’. Estes são atualmente um dos porta-enxertos utilizados para a noqueira destinada à produção de fruto. Estes híbridos foram descritos pela primeira vez em 1914 por Luther Burbank, após a observação de plantas resultantes de cruzamentos naturais entre a noqueira negra do norte da Califórnia (*J. hindsii*) e *J.*

regia. Estes foram os primeiros ‘Paradox’, mas atualmente o conceito foi alargado e a designação ‘Paradox’ aplica-se a qualquer planta híbrida resultante do cruzamento natural ou controlado entre noqueiras negras americanas (*J. californica*, *J. major*, *J. nigra*) e a noqueira Pérsica.

Esta seleção conduziu à obtenção de três indivíduos designados por ‘Vlach’, ‘VX211’ e ‘RX1’, os dois últimos com patente que protegem os direitos de obtentor. Os três clones, apresentam características distintas, que podem ser consultadas na tabela 3, e são atualmente multiplicados por via vegetativa, recorrendo a processos de cultura *in vitro*. Os híbridos foram submetidos a um intenso trabalho de seleção tendo em conta o vigor induzido, a resistência/suscetibilidade a problemas relacionados com o solo (podridão radicular causada por *Armillaria mellea*, *Phytophthora*, necrose na zona de enxertia causada pelo Cherry Leafroll Virus (CLRV), tolerância ao encharcamento e à seca, compatibilidade na enxertia e facilidade de transplantação (McGranhan, 2007).

Tabela 3. Avaliação de porta-enxerto clonais de ‘Paradox’ relativamente ao vigor, resistência a nematodes e outras patologias (Adaptado de Universidade Califórnia, 2014)

PORTA-ENXERTOS	‘Vlach’	‘VX211’	‘RX1’
Vigor dos porta-enxertos			
Resistência a <i>Phytophthora citricola</i> .	LR	MR	MR-HR
Resistência a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	LR	LR	HR
Resistência a <i>agrobacterium tumefaciens</i>	LR	LR	MR
LR- Baixa resistência; MR- Resistência moderada e HR- alta resistência			
Galhas das raízes Nematode	S-IT	S-ST	
Lesão nas raízes Nematode (<i>Pratylenchus vulnus</i>)	HS-IT	S-ST ³	S-IT
IT- As árvores não toleram a presença de nematodes; HS- Alta Suscetibilidade; S- suscetível; ST- Alguma tolerância a presença de nematodes na árvore			
Notas: 1- Dados de campo de acordo com os dados do curso UC e ensaios USDA-ARS;			
2- O vigor do porta-enxerto não se reflete necessariamente no vigor da copa			
3- Tolerância a Nematodes pós-infeção desenvolve resistências.			

2.3. Técnicas de propagação em *Juglans sp.*

2.3.1. Propagação por via seminal

A maior parte da produção mundial de noz provém ainda hoje de variedades enxertadas em porta-enxertos de origem seminal, o que reflete a dificuldade do enraizamento por

estacaria das espécies que integram o género *Juglans* e conseqüentemente a dificuldade em obter porta-enxertos clonais, com resistência a condições edafoclimáticas menos favoráveis, a doenças, ou a pragas (McGranahan e Catlin, 1987).

Para se obter uma boa germinação das sementes é necessário proceder à sua re-hidratação e à quebra da dormência fisiológica do embrião. Assim, estas devem ser préviamente imersas em água durante 2-4 dias. Este processo permite a re-hidratação da semente e o amolecimento do tegumento. As sementes que no final desse período se mativeram a flutuar, devem ser rejeitadas. No hemisfério norte este trabalho é normalmente efetuado no início do inverno. Depois disso, as sementes são colocadas durante 3-4 meses em estratificação a uma temperatura de 3-4°C e humidade elevada, para quebra da dormência do embrião. São depois semeadas, normalmente em contentores, num substrato com turfa e perlite na proporção 2:1 (v/v) (Gandev e Arnaudov, 2011).

As plantas assim obtidas apresentam uma elevada variabilidade devido ao nível de heterozigocidade da espécie, o que compromete a uniformidade das plantações e homogeneidade do seu vigor e das suas produtividades.

A noqueira foi durante muito tempo enxertada sobre franco, mas, durante a primeira metade do século XX, híbridos naturais entre a noqueira negra da califórnia (*Juglans hindssi*) e a noqueira pérsica (*Juglans regia*) passaram a ser os porta-enxertos mais utilizados. A isso uma conjugação de características que resultou num menor vigor induzido, que conduzia a uma redução do período improdutivo do pomar, resistência à podridão do colo e das raízes, causadas pelo fungo *Armillarea mellea* e, principalmente, uma maior tolerância tanto ao encharcamento como ao *stress* hídrico. Estes híbridos receberam o nome comum de ‘Paradox’ e as suas características foram apresentadas no capítulo 2.2. Atualmente, a maioria dos pomares a nível mundial são enxertados em *J.regia.L.*

2.3.2. Propagação por enxertia

2.3.2.1. Enxertias de gomo

A enxertia mais utilizada na noqueira é a de placa, sendo uma das técnicas mais antigas de propagação tanto em viveiro como no local definitivo (Kuniyuki e Forde, 1985 citado por Gandev, 2007).

Foram os franceses os primeiros a desenvolver a técnica de enxertia de placa em nogueiras de forma comercial (Leslie e McGranahan, 1998, citado por Zyl, 2009).

Esta enxertia pode fazer-se no final da primavera/início do verão, de gomo pronto, ou, no final do verão/início do outono, de gomo dormente.

Para se executar mais facilmente esta técnica de enxertia, utiliza-se uma faca de dupla lâmina para tirar um fragmento com a forma de um quadrado da casca do porta-enxerto numa zona de entrenó. Este é depois substituído por um quadrado com as mesmas dimensões (placa com gomo) da variedade a enxertar. A zona de enxertia é depois isolada com uma fita que seja elástica permitindo assim uma perfeita justaposição dos tecidos cambiais ao mesmo tempo que oferece proteção contra condições atmosféricas adversas.

(http://fruitandnuteducation.ucdavis.edu/education/fruitnutproduction/Walnut/Walnut_Propagation/).

De um modo geral, os resultados obtidos na Europa com a enxertia de placa têm sido fracos e inconsistentes. Na Eslovénia, Solar et al. (2001), (citados por Gandev, 2007), referem taxas de sucesso de cerca de 16% para enxertia de placa de gomo dormente.

Estes autores atribuíram o insucesso registado a fortes amplitudes termicas e à ocorrência de precipitação durante os ensaios, que conduziu a um excesso de humidade sob a zona da enxertia. Na Turquia, utilizado a enxertia de gomo pronto, Erdogan (2006), refere taxas de sucesso mais animadoras, entre os 33 e os 96%. No entanto, segundo o mesmo autor, a taxa de sobrevivência das plantas enxertadas ficou pelos 33-66%, tendo sido fortemente condicionada pelas condições climatéricas do inverno seguinte à enxertia.

Na Africa do Sul, os resultados obtidos com a enxertia de gomo pronto também conduziram a baixas taxas de sucesso, com uma sobrevivência das plantas no ano seguinte à enxertia a variar entre 10 e 70% (Rotondo Walnut, 2007, citado por Zyl, 2009).

Nós últimos anos enxertia de placa tem sido substituída nos USA pela enxertia de gomo em 'T'. Para executar esta técnica, começa por se fazer um pequeno corte em 'T' num entrenó do porta-enxerto no qual é colocado um gomo da variedade a enxertar. Após a colocação do enxerto a enxertia deve ser atada tal com se descreveu para a enxertia de placa. Os períodos de execução são os já referidos para a enxertia de placa e a enxertia pode ser realizada de borbulha ou de gomo destacado.

[\(http://fruitandnuteducation.ucdavis.edu/education/fruitnutproduction/Walnut/Walnut_Propagation/\)](http://fruitandnuteducation.ucdavis.edu/education/fruitnutproduction/Walnut/Walnut_Propagation/)

A enxertia de gomo, seja ela de placa ou de gomo destacado, é utilizada nos USA, aparentemente com taxas de sucesso muito elevadas, mas, curiosamente, não nos foi possível encontrar quaisquer referências bibliográficas sobre este assunto.

2.3.2.2. Enxertia de garfo

Pela facilidade de execução relativamente à enxertia de gomo e pela possibilidade de mecanização, a enxertia em garfo tem sido uma técnica muito investigada em noqueira. As modalidades de enxertia em garfo mais utilizadas na noqueira são as de cunha, fenda-inglesa e ómega e podem ser executadas no campo, tanto em viveiro como no local definitivo e também em bancada.

Nas enxertias de campo, as técnicas mais utilizadas são a cunha e a fenda inglesa e neste caso a enxertia realiza-se no início da primavera, preferencialmente após o abrolhamento do porta-enxerto. Utilizam-se garfos recolhidos durante o inverno precedente, após terem recebido as horas de frio necessárias para a quebra de dormência. Nas enxertias de bancada, qualquer uma das técnicas é utilizada, sendo que a enxertia ómega permite um grau elevado de mecanização.

Estas enxertias são normalmente executadas utilizando porta-enxertos e garfos que ainda não receberam as horas de frio necessárias à quebra de dormência, de forma a evitar o seu abrolhamento e conseqüentemente o consumo de reservas antes da formação do calo de enxertia. Assim, a sua execução no outono e início de inverno, são os períodos mais eficazes, já que as plantas após a enxertia podem ainda receber as horas de frio necessárias para um normal abrolhamento na primavera (Zyl, 2009).

De um modo geral, a enxertia de garfo apresenta taxas de sucesso inferiores aos conseguidos com enxertia de gomo. Por exemplo, Demiroren e Buyukyilmaz, 1988 referem taxas inferiores a 20% para enxertias de garfo realizadas durante a primavera e atribuem esse facto a temperaturas baixas e amplitudes térmicas elevadas. Barut, (2001) também refere baixas taxas de sucesso (20-32%) com a utilização da enxertia em cunha durante a primavera, não apresentando no entanto razões para o fraco pegamento das enxertias. Achim e Botu (2001), conseguiram melhores resultados (50-70%) com a enxertia em fenda inglesa realizada no campo, tendo procedido ao transplante prévio dos porta-enxertos.

Nos exemplos anteriores fez-se referência a dois dos aspetos que mais condicionam as enxertias realizadas em campo durante o período de crescimento ativo, a temperatura e sua flutuação e o afluxo de seiva à zona de enxertia.

Relativamente à necessidade de redução do afluxo de seiva à zona de enxertia, o transplante dos porta-enxertos tal como referido por Achim e Botu (2001), pode ser uma solução, outra é a execução da enxertia após o abrolhamento do porta-enxerto, sendo que este deve ser cortado e efetuadas incisões abaixo da zona de enxertia, sem causar anilhamento da planta, 7-10 dias antes da realização da mesma, tal como proposto pelos serviços de extensão da Universidade da Califórnia, em (http://fruitandnuteducation.ucdavis.edu/education/fruitnutproduction/Walnut/Walnut_Propagation/)

Já as condicionantes ambientais, temperatura e humidade, são mais difíceis de controlar nestas condições. Por esse motivo, os investigadores têm analisado a possibilidade de realização deste tipo de enxertias, em bancada com indução da formação do calo de enxertia em ambiente controlado (Van't Westeinde 1990; Stanisavljević e Mitrović 1997; Achim e Botu 2001; Özkan e Gümüs 2001; Erdogan 2006; Gandev 2007).

Um compromisso entre a temperatura e a humidade pode ser suficiente para permitir o sucesso da formação do calo. Por exemplo, Erdogan (2006), refere que o método de aquecimento localizado da zona do calo é usado na Turquia e apresenta taxas de sucesso que atingiram os 82%.

Uma temperatura constante e elevada, já tinha sido referenciada por Sitton (1931), quando referiu os 27°C como a temperatura ótima para formação do calo de enxertia em noqueiras.

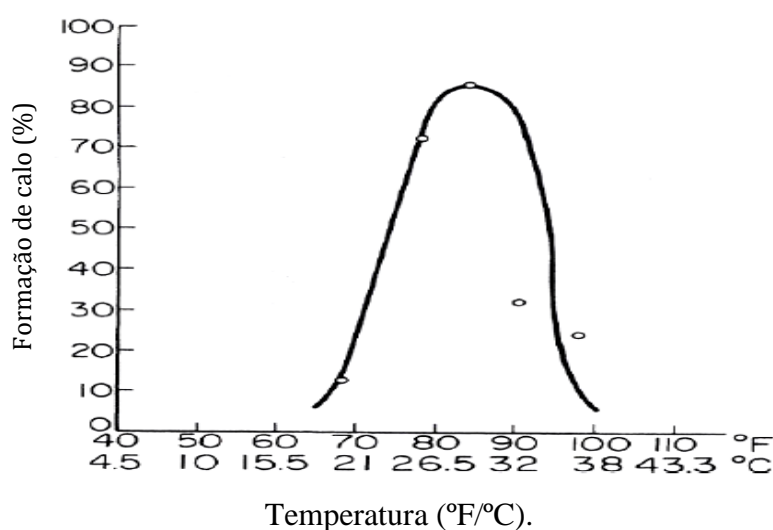


Figura 1. Influência da temperatura na formação do calo em noqueira (Adaptado de Hatmann et al., 2002, citado por Zyl, 2009)

Estudos posteriores (Rongting e Pinghai, 1993; Reil et al, 1998; Hartmann et al, 2002 citado por Zyl, 2009) confirmaram que temperaturas 26 a 27 °C são as ideais, ainda que uma temperatura não inferior a 22°C possa ser suficiente para uma boa formação de calos de noqueira, abaixo de 20°C, a formação de calos torna-se insatisfatória (Figura 1).

Atualmente existem duas formas de controlar a temperatura durante o processo de enxertia em noqueiras são eles o aquecimento da planta completa em salas climatizadas (estratificação) e o aquecimento apenas da zona de enxertia (Zyl, 2009). O mesmo autor refere como principal desvantagem do primeiro processo, o facto de as temperaturas elevadas das salas de estratificação promoverem o abrolhamento tanto do enxerto como do porta-enxerto, levando assim a um consumo de reservas que deveria ser utilizado para a formação do calo. Este facto obriga a que as enxertias devam ser realizadas antes que os dois biontes tenham recebido as horas de frio necessárias à quebra da dormência, reduzindo substancialmente o tempo útil para a sua execução.

A aplicação de calor apenas na zona do calo, reduz os problemas atrás mencionados mas apresenta dificuldades técnicas de execução, mesmo com a utilização do dispositivo criado propositadamente para o efeito por Lagerstedt (1984), e esquematicamente representado na figura 2.

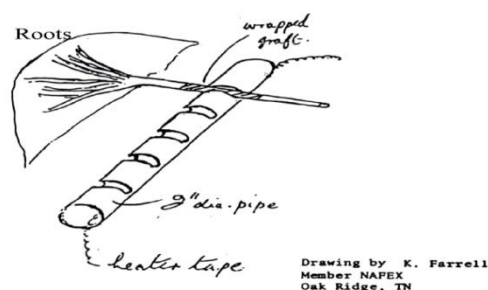


Figura 2. – Tubo de calor na zona de enxertia (Adaptado de Lagerstedt, 1984)

Por qualquer um dos processos mencionados as taxas de sucesso na enxertia têm atingido valores médios entre os 56 e os 84% (Lantos, 1990, citado por Zyl, 2009).

Vários autores têm realizado ensaios com a metodologia de aquecimento localizado da zona de enxertia (Avanzato e Tamponi, 1988; Atefi, 1997; Avanzato e Atefi, 1997; Porebski et al, 1999; Achim e Botu, 2001; Porebski et al, 2002; Avanzato et al., 2006), todos eles referindo taxas de sucesso significativamente superiores quando comparadas com o controlo sem aquecimento. Avanzato e Tamponi (1988), por exemplo, obtiveram

73% de sucesso com este método, significativamente mais do que o controlo não aquecido, onde apenas 6% das enxertias pegaram.

Gandev e Arnaudov (2011), testaram recentemente em noqueira a enxertia de garfo sobre epicótilo, tendo obtido uma taxa média de pegamentos entre os 56 e os 63%. Para a execução desta técnica é necessário em primeiro lugar quebrar a dormência das sementes, tal como referido em 2.3.1. Faz-se de seguida a germinação e, a enxertia, é executada logo que os epicótilos apresentem um diâmetro aproximado entre os 5-8 cm. O enxerto, com as mesmas dimensões, provém de uma árvore adulta, sendo recolhido nos ramos do ano durante o período de dormência e mantido em câmara frigorífica até à altura de execução da enxertia. O garfo é talhado em cunha, sendo a enxertia efetuada por incrustação de topo e a zona de enxertia isolada com uma fita de plástico, que não deve estar exageradamente apertada por forma a permitir a saída do excesso de seiva no local de enxertia. As plantas são mantidas em temperatura controlada 25-27 °C e a formação do calo de enxertia ocorre 14-20 dias após a realização da mesma (Gandev e Arnaudov, 2011). Os mesmos autores verificaram que a altura do ano condicionava a taxa de sobrevivência das plantas, sendo que, para as condições em que decorreram os ensaios (Fruit Growing Institute – Plovdiv-Bulgaria) a enxertia realizada no final de Março conduziu a percentagens de pegamento mais elevadas que a realizada em Abril. Esta técnica não é a mais interessante dado que apresenta heterogeneidade proveniente do porta-enxerto, mas pode ser útil para melhorar o conhecimento atual sobre outras técnicas de enxertia, incluindo a micro-enxertia *in vitro*.

2.3.3. Propagação por estacaria

É um facto bem conhecido que as noqueiras são mais difíceis de propagar do que a maioria das outras espécies fruteiras de zona temperada, tanto por estacaria lenhosa como semi-lenhosa, (MacDonald, 1987; Reil et al., 1998; Hartmann et al., 2002 citados por Zyl, 2009). Para além das baixas taxas de enraizamento verifica-se uma elevada mortalidade das plantas enraizadas durante a aclimatização e após a plantação no local definitivo (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2010).

(Claudet et al., 1992 e Yalcin, 1993) sugeriram que, especialmente na estacaria lenhosa, a continuidade do anel de esclerênquima pode ser um obstáculo à emergência das raízes (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2010). (Jay-Allemand et al., 1995, citados por Gunes, 1999), referiram que a juglona (hidroxi-1,4-naftalendiona) é um fator endógeno de grande importância na indução do enraizamento. Estes autores, trabalhado com *Juglans*

sp. em micropropagação, encontraram uma correlação positiva entre os conteúdos endógenos de juglona e a capacidade de enraizamento de microestacas. Muitos autores estudaram este composto, especialmente devido à sua atividade alelopática, mas, sobre uma possível influência no enraizamento adventício, não foi possível encontrar outras referências.

Muitos outros compostos conhecidos como sendo capazes de influenciar a formação de raízes adventícias, foram também estudados para tentar melhorar a eficiência do enraizamento por estacaria em *Juglan* sp., a aplicação externa de auxinas, poliaminas, compostos fenólicos, ou hidratos de carbono, são apenas alguns exemplos, mas, em caso algum se conseguiu associar estes compostos a uma taxa de enraizamento aceitável, num procedimento que fosse estável ao longo do tempo.

Ainda assim, pontualmente, conseguiram-se resultados interessantes. Por exemplo, Sutter e Mckenna (1995), utilizando híbridos F1 de 'Paradox' e híbridos resultantes do retrocruzamento entre 'Paradox' F1 x *Juglans regia* referiram taxas de enraizamento entre 40-79% para estacaria semi-lenhosa e taxas até 80% em estacaria lenhosa. Neste último caso os melhores resultados foram obtidos utilizando um tratamento para indução radicular que combinava uma poliamina (espermina), compostos fenólicos e sal potássico de AIB (K-AIB).

Não obstante os bons resultados obtidos por estes autores no que respeita ao enraizamento, a reprodutibilidade dos ensaios não foi conseguida e as taxas de sobrevivência das plantas no campo após 1 ano foi bastante baixa, 8,5% para as plantas resultantes de estacaria semi-lenhosa e 27,2% para as resultantes da estacaria lenhosa.

A partir da década de 90, reduzem-se significativamente as publicações relativas a ensaios sobre a propagação de *Juglans*, tanto por estacas lenhosas como por estacas semilenhosas. Por sua vez, aumentam as publicações relacionadas com a propagação *in vitro*, sendo de inferir que, por um lado, não se conseguiu melhorar as metodologias de enraizamento de estacas, e, por outro, que as técnicas de micropropagação *in vitro* abriram perspectivas de sucesso mais interessantes.

2.3.4. Micropropagação

2.3.4.1. Descrição geral e Potencialidades da técnica

A micropropagação começa a ser vista como uma alternativa às técnicas clássicas de propagação da noqueira anteriormente referidas. A micropropagação possibilita a

obtenção, tanto de variedades autoenraizadas para solos com boas condições de drenagem, como de porta-enxertos clonais, eliminando assim a utilização de porta-enxertos seminais e todas as desvantagens de heterogeneidade ao nível das plantas no pomar que lhes estão associadas.

Mas a micropropagação da noqueira também não se revelou tarefa fácil e só nos últimos anos se têm conseguido resultados que levam a pensar no desenvolvimento desta técnica para uma ampla aplicação comercial (Lopez, 2001; Navatel e Bourrain, 2001 citados por Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011).

Em relação às técnicas tradicionais de propagação vegetativa da noqueira, a micropropagação apresenta como principais vantagens a capacidade de gerar rapidamente um grande número de plantas geneticamente idênticas e com elevada qualidade sanitária, pois todo o processo é feito em condições de assepsia, num curto espaço de tempo (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011).

Existem três vias para a regeneração clonal de plantas *in vitro*, a organogénese, a embriogénese somática e a multiplicação por rebentação axilar. Em espécies onde as técnicas de micropropagação *in vitro* estão a dar os primeiros passos, como é o caso da noqueira, a mais usada é a multiplicação por rebentação axilar. A técnica consiste em estimular primeiro o desenvolvimento dos gomos pré-existentes no explante inicial, depois da sua colocação num meio de cultura *in vitro*, depois, no estímulo do desenvolvimento de novos gomos neo-formados e seu posterior enraizamento, num processo que se divide nas várias fases que seguidamente se apresentam.

2.3.4.2 Fases do processo de micropropagação

2.3.4.2.1. Escolha do explante inicial e colocação em cultura asséptica

A escolha do explante e a sua iniciação em cultura asséptica são aspetos de extrema importância no estabelecimento de um protocolo de cultura *in vitro*. Esta escolha é influenciada, entre outros fatores, pelo método a ser adotado na propagação *in vitro*. Enquanto nos processos de organogénese e embriogénese somática se utilizam explantes sem células meristemáticas preformadas, resultantes por exemplo de fragmentos de folhas ou entrenós de caules e se promove uma desdiferenciação prévia a nível celular, para a reaquisição do estado meristemático primário, já nos processos em que se promove a rebentação axilar, os novos explantes originam-se a partir do desenvolvimento dos pontos meristemáticos do explante inicial, sendo frequentemente

utilizados fragmentos de caules com pelo menos um gomo, seja ele axilar ou terminal (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011).

Também a idade do explante inicial é um fator importante no sucesso de todos os processos de cultura *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais, sendo que, os explantes próximos da condição juvenil, respondem invariavelmente melhor do que os adultos. Deste modo, o rejuvenescimento prévio de árvores adultas, por podas vigorosas que forcem a rebentação de gomos situados no cone juvenil da planta, ou por enxertia em cascata sobre explantes de origem seminal, são procedimentos frequentemente utilizados para o efeito (Peixe, comunicação pessoal).

Explantes retirados de jovens plantas obtidas por via seminal, são os que melhor respondem e são muitas vezes utilizados durante as fases iniciais de desenvolvimento de processos de cultura *in vitro*, mas, quando o objetivo é a propagação clonal de uma planta específica, em espécies alogâmicas, a sua utilização está condicionada, pois estes apresentam um elevado grau de heterozigocidade e conduzem a populações heterogêneas.

Escolhido o explante inicial, importa depois conseguir-se o seu estabelecimento e a manutenção em condições assépticas. O sucesso desta fase só é conseguido se existir um compromisso entre uma adequada desinfecção do material vegetal e uma boa taxa de sobrevivência dos explantes. Conseguir este compromisso é um processo lento e delicado porque o grau de infecção das superfícies dos tecidos é muito variável. Para cada espécie e para cada tipo de explante é necessária a realização de ensaios com diferentes combinações de substâncias químicas, várias concentrações e diferentes tempos de contacto.

Em cultura *in vitro* diversos processos de desinfecção são utilizados, como por exemplo:

- O hipoclorito de cálcio em concentração de 4-8% de cloro ativo porque não penetra praticamente nos tecidos permitindo que eles evoluam. Este é um produto pouco estável em solução aquosa e necessita de ser preparado no momento do uso.
- O bicloreto de mercúrio é também utilizado, é um produto muito eficaz na esterilização e é usado em doses de 0,01 a 0,05%. Precisa de mais lavagens que os outros produtos, pois é difícil de eliminar.
- O mercurobutol, é um excelente esterilizante pois contém um detergente que aumenta o seu poder de penetração e eficácia, mas é difícil de eliminar dos tecidos vegetais (Augé et al., 1989).

Quando se utilizam detergentes com agentes tensioativos, que aumentam a capacidade de fixação do desinfetante às superfícies a desinfetar, é vulgar utilizar-se Tween20 a $0,01\text{mL}^{-1}$. Deve no entanto salientar-se, que a esterilização de material vegetal é realizada na superfície, e, por isso, se os tecidos estão infetados no interior, não é possível esterilizar (Lopes, 2011).

Em noqueira, o processo de desinfeção superficial, inicia-se geralmente com uma passagem dos explantes em água corrente durante 4-6 horas para lavagem dos exsudados fenólicos. Seguidamente utiliza-se etanol 50-70% por 20 a 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio com 3-5% de cloro ativo adicionado de tween 20 a 0,01% por 10-20 minutos. No final realizam-se várias lavagens rápidas com água estéril para eliminar totalmente os resíduos dos desinfetantes (Leal et al., 2007).

2.3.4.2.2. Fase de Multiplicação

Uma vez conseguida a instalação da cultura em condições assépticas, segue-se a otimização das condições de multiplicação. A viabilidade dos processos de propagação *in vitro* está fortemente dependente das taxas de multiplicação conseguidas. Só poderão ser comercialmente competitivas, se forem obtidas taxas de multiplicação elevadas, uma vez que o processo requer um elevado nível de especialização, de mão-de-obra e de energia.

Existem vários fatores, endógenos e exógenos que podem limitar o sucesso das taxas de multiplicação, é o caso do genótipo, da composição mineral do meio de cultura, da fonte de carbono, dos níveis e tipo de reguladores de crescimento, do agente gelificante, da luz e da temperatura.

No que diz respeito ao genótipo, por exemplo, Saadat et al., (2002), ao testarem três tipos de auxinas em duas concentrações diferentes e em diferentes cultivares de noqueira, verificaram que os explantes originados a partir de plantas da cultivar ‘Serr’ respondiam *in vitro* com taxas de multiplicação mais elevadas que os originados a partir da cultivar ‘Franquette’. Por sua vez, Vahdati et al., (2009) utilizaram nos seus ensaios explantes de *Juglans regia* provenientes de plantas com 5 anos de idade resultantes da germinação de sementes, que foram agrupadas em função do seu vigor vegetativo, em plantas de vigor alto, médio e baixo. Em função do vigor, compararam as respostas dos vários genótipos no que respeita à facilidade de instalação *in vitro* e às taxas de multiplicação. Verificaram que os genótipos de baixo vigor apresentaram 75% de

sucesso na fase de estabelecimento enquanto os de alto vigor apenas apresentaram 25% de sucesso. Relativamente aos aspetos relacionados com a capacidade de multiplicação *in vitro*, estes autores verificaram que genótipos de baixo vigor, apresentavam um maior número de rebentos por explante e um maior número médio de gomos por rebento, conduzindo a uma maior taxa de multiplicação final.

Relativamente à formulação mineral do meio de cultura, desde 1984, que para a noqueira, se utiliza maioritariamente o meio conhecido por DKW e desenvolvido nessa altura por Driver e Kuniyuki. Este meio foi desenvolvido para os híbridos ‘Paradox’, mas, de um modo geral tem conduzido a uma boa resposta para a maioria das Juglandaceas.

Tentando explicar a razão pela qual o meio DKW se revela tão apropriado para a noqueira, Saadat e Hennerty (2002), dizem que esta necessita de um elevado nível de azoto na fase de multiplicação dos rebentos e o meio DKW tem uma concentração iónica de azoto semelhante a um dos meios mais usados em cultura *in vitro*, o meio MS Murashige e Skoog (1962), mas também possui altas concentrações de outros iões que não estão presentes na formulação MS. Outro meio também muito utilizado em cultura *in vitro* de espécies lenhosas é o meio Woody Plant Medium (WPM) desenvolvido por Lloyd e McCown (1981), mas, segundo os mesmos autores também este não se tem revelado interessante para a noqueira porque possui uma baixa concentração iónica.

Não obstante o meio DKW tenha revelado até agora ser o mais favorável à multiplicação *in vitro* da noqueira, a verdade é que alguns autores como Saadat e Hennerty (2002), não observaram diferenças significativas entre este meio e o meio MS, em ensaios onde observaram parâmetros como o peso fresco do rebento, o peso fresco do calo e o comprimento do maior rebento.

Em trabalhos mais recentes, Paygahzadeh e Kazemitabar (2011), testaram diversas formulações minerais que são vulgarmente utilizadas na propagação de outras plantas lenhosas, entre estas contam-se as formulações MS e WPM referidas anteriormente. Estes autores referem que qualquer uma destas formulações levou a uma deterioração gradual dos explantes após um certo número de subculturas.

Os hidratos de carbono são uma fonte de energia para os tecidos e mantêm o potencial mínimo osmótico do meio (Conger, 1980). A fonte de carbono mais utilizada nos processos de cultura *in vitro* é a sacarose mas, açúcares como a glucose, a maltose, a frutose e a galactose são alternativas ao uso de sacarose na cultura *in vitro* de tecidos vegetais (George e Sherrington, 1984). Nos diversos ensaios desenvolvidos por

(Marques e Dias 2001, citados por Lopes 2011), a sacarose revelou-se o hidrato de carbono mais adequado à cultura *in vitro* da noqueira.

Quanto aos reguladores de crescimento (auxinas, citocininas, giberelinas, etc.), é conhecido o seu envolvimento em todos os processos fisiológicos da planta, como tal, é enorme a sua influência na resposta do explantes ao longo das diferentes fases da cultura *in vitro*.

Na fase de multiplicação, são as citocininas os reguladores de crescimento que mais influenciam as respostas obtidas.

Com o objetivo de determinar as concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) mais adequadas para a multiplicação e alongamento dos rebentos Saadat et al., (2002) testaram em explantes de *Juglans regia* obtidos a partir da geminação de sementes selecionadas, cinco concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mgL⁻¹), tendo em todas as formulações sido adicionada a mesma quantidade de uma auxina, o AIB (ácido indol-3-butírico), a 0,01 mgL⁻¹. Constataram estes autores que o meio de cultura com 0,2 mgL⁻¹ de BAP e 0,01 mgL⁻¹ AIB não era adequado para o alongamento dos rebentos devido ao largo espaço inter-nodal e ao fino caule que estes possuíam, características que desfavorecem a planta nas fases de enraizamento e aclimatização posteriores. Usando 0,4 e 0,6 mgL⁻¹ de BAP e 0,01 mgL⁻¹ de AIB, obtiveram bom alongamento dos rebentos, com morfologia, desenvolvimento foliar e número médio de gomos adequados, assim como um bom diâmetro e comprimento caulinar. Foram no entanto as concentrações de BAP mais elevadas, 0,8 e 1 mgL⁻¹ que apresentaram as melhores taxas de multiplicação dos rebentos, devido a uma maior percentagem de gomos axilares desenvolvidos. A utilização de BAP a 1 mgL⁻¹ associada a AIB a 0,01 mgL⁻¹, tem hoje uma aplicação mais ou menos generalizada na fase de multiplicação *in vitro* de porta-enxertos e cultivares de noqueira.

Relativamente aos agentes gelificantes, tanto o agar-agar como o Phytigel®, ou a Gelrite, são utilizados na cultura de tecidos vegetais, ainda que o Phytigel® esteja a ser cada vez mais usado porque forma um gel relativamente claro, mais uniforme e não possui contaminantes (Pierik, 1987 citado por Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011). Em noqueira, Saadat e Hennerty (2002), obtiveram uma elevada taxa de multiplicação, cerca de 2,7 novos rebentos por explante, nos meios MS e DKW, quando estes foram gelificados com Phytigel®. Estes autores avaliaram também o efeito do agente gelificante nas taxas de crescimento dos rebentos e na ocorrência de cloroses, tendo chegado a resultados coincidentes com os já publicados por Leslie e McGranahan

(1992), quando referiram que as taxas crescimento eram mais baixas e ocorria uma maior incidência de clorose, nos explantes cultivados em meio DKW gelificado Difco-Bacto-Agar por comparação com os cultivados em meio Phytigel®.

A gelrite também foi utilizada para gelificar os meios de cultura em noqueira, mas, é frequentemente referido que este agente gelificante provoca vitrificação dos explantes, em cultura. Leslie e McGranahan (1990), afirmam no entanto, que, tal pode ser evitado com a utilização de recipientes de cultura ventilados.

Quanto às condições ambientais da sala de cultura, muito poucos trabalhos se tem feito sobre o assunto. Quanto à luz, sabe-se que, para conseguir uniformidade na resposta dos explantes, deve existir uma dispersão uniforme por toda a sala de cultura, e ainda que a intensidade luminosa deve situar-se entre os 40-45 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, com um fotoperíodo de 16 h (Leal et al., 2007). Relativamente à temperatura, segundo Amiri e Gharati (2012), deve manter-se entre os 23 – 25 °C.

2.3.4.2.3. Fase de Enraizamento

Depois de conseguida uma taxa de multiplicação elevada é necessário estabelecer-se um protocolo para otimizar o enraizamento dos explantes. Características como um bom alongamento, diâmetro do caule, desenvolvimento foliar e número médio de gomos desenvolvidos durante a multiplicação, estão fortemente ligados à posterior taxa de enraizamento conseguida.

Esta fase pode ser dividida em duas subfases, a indução e expressão radical.

Em noqueira, existe para estas duas fases um procedimento mais ou menos estandardizado. Na subfase de indução é necessário um meio sem as citocininas, que foram importantes no meio de multiplicação, pois está provado que a sua presença nesta fase inibe a formação de raízes. Os explantes, com 4-5 cm, são assim estabelecidos em meio DKW (macronutrientes reduzidos a ¼) suplementado com 5 mgL^{-1} de AIB e 30 gL^{-1} de sacarose e colocam-se no escuro por 6-10 dias a 24 °C durante 16 horas e 21 °C nas restantes 8 horas (Scaltsoyiannes et al., 1997). Na subfase de expressão, os explantes são transferidos para 200ml de vermiculite esterilizada, a qual é humedecida com meio DKW, com os macronutrientes reduzidos a ¼, sem reguladores de crescimento e adicionado de 8 gL^{-1} de agar-agar.

Veremos de seguida como se chegou a este protocolo.

2.3.4.2.3.1. Alguns Fatores com Influência na Subfase de Indução Radical

2.3.4.2.3.1.1. O Genótipo

Como já referido anteriormente, o genótipo desempenha um papel fundamental na micropropagação e condiciona a capacidade de adaptação dos explantes colocados em cultura, as suas taxas de multiplicação e a sua capacidade de enraizamento, assim como a posterior facilidade de aclimatização. Vahdati et al., (2009) compararam as respostas nesta fase de genótipos de alto e baixo vigor de genótipo de ‘persian’, tendo verificado que as melhores taxas de enraizamento assim como o maior número médio de raízes se conseguiam nos genótipos de baixo vigor (tabela 4).

Tabela4. Influência do vigor da planta mãe em vários parâmetros relacionados com a fase de enraizamento *in vitro* (Adaptado de Vahdati et al., 2009)

Genótipo	Vigor	Parte aérea do explante	Comprimento da parte aérea do explante	Número de nós	Tamanho do calo ^B	Cor das folhas ^C
G8	HV	2.3b ^A	4.5 ^a	7.4 ^a	2.5 ^a	1.3b
G9	SV	2.2b	3.1bc	6.8 ^a	2.3 ^a	1.3b
G16	LV	3.0ab	3.6ab	6.6 ^a	1.6bc	2.7 ^a
G4	LV	3.3ab	2.9bc	7.5 ^a	1.9ab	2.7 ^a
G12	LV	3.3ab	2.6c	7.2 ^a	1.4c	2.6 ^a

^A Médias seguidas pela mesma letra (s) diferenças não significativas ($p \leq 0.01$).

^B Com base na pontuação de 1-3: 1= menos, 2= médio e 3= excessivos calós basais e formação de microestacas. ^C Com base na pontuação 1-3: 1= clara, 2= média e 3= cor escura das folhas.

HV- alto vigor, SV-médio vigor e LV- alto vigor.

Os autores atrás citados apontam o baixo teor endógeno de giberelinas e o menor grau de lenhificação, como os atributos que favorecem os genótipos de baixo vigor na fase de enraizamento.

2.3.4.2.3.1.2. A Composição Mineral dos Meios

Na maior parte das espécies lenhosas, em que o enraizamento não se consegue naturalmente no meio de multiplicação, as formulações dos meios de cultura usados durante a fase de enraizamento diferem dos utilizados na fase de multiplicação, principalmente na sua composição em macronutrientes. É muito vulgar utilizar nesta

fase, meios com uma concentração iônica mais baixa, ou então, optar pela utilização do mesmo meio mas com uma redução da concentração em macronutrientes para $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$. Em nogueira, a utilização do meio DKW com os macronutrientes reduzidos a $\frac{1}{4}$ tem até agora conduzido aos melhores resultados. Utilizando esta formulação, Dolcet-Sanjuan et al., (1996) em ensaios efetuados com explantes jovens e adultos de *Juglans regia* cv. 'Serr', obtiveram taxas de enraizamento entre 25-40% para os tecidos jovens, e 5-12% para os tecidos adultos (Figura 3).

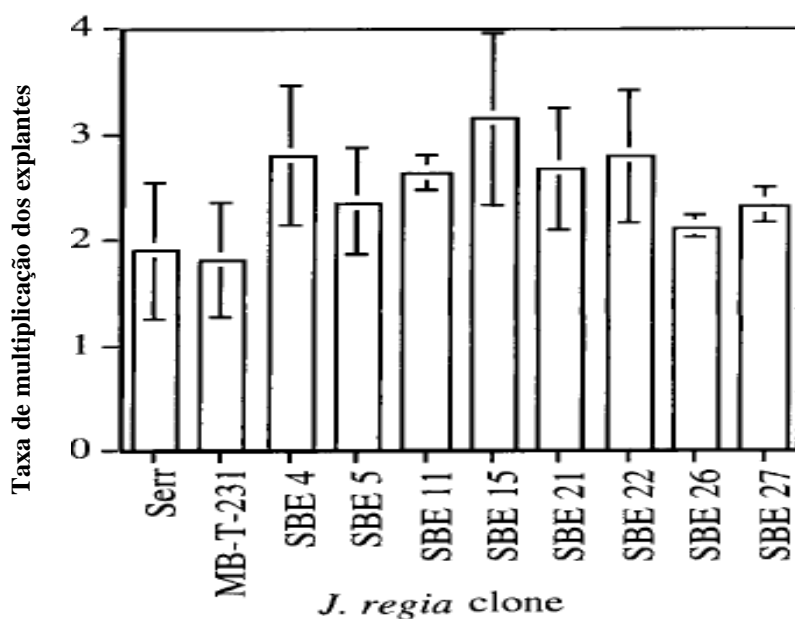


Figura 3. Taxas de multiplicação *in vitro* usando material adulto ('Serr' e MBT-T-231) e jovem (SBE 4, SBE 5, SBE 11, SBE 15, SBE21, SBE22, SBE 26, SBE 27) de clones de *Juglans regia*, após 5 a 15 repicagens em meio de multiplicação (Adaptado de Dolcet-Sanjuan et al., 1996)

Também (Allemand et al., 1993, citados por Caboni e Damiano 2006), reportaram a redução dos macronutrientes do meio DKW para $\frac{1}{4}$, como um procedimento adequado na fase de indução de raízes de híbridos de nogueiras (*Juglans nigra* x *Juglans regia*). Mais recentemente, Caboni e Damiano (2006), em ensaios onde compararam a utilização dos meios MS e DKW, formulação original e com os macronutrientes reduzidos a $\frac{1}{2}$ e a $\frac{1}{4}$, também concluíram que o meio DKW conduzia aos melhores resultados. Segundo Payghamzadeh e Kazemitabar (2011), ainda que por uma questão de equilíbrio nutricional se faça uma redução generalizada dos macronutrientes, na verdade, é o decréscimo na concentração de KNO_3 e NH_4NO_3 , o fator decisivo para melhorar as percentagens de enraizamento.

2.3.4.2.3.1.3. Os Hidratos de Carbono

Os açúcares são agentes muito importantes na regulação dos potenciais osmóticos dos meios, assumindo um papel fundamental nas diferentes fases do processo de micropropagação e o enraizamento não é exceção.

Dolcet-Sanjuan et al., (1997) testaram o efeito de três níveis de sacarose (0; 15 e 30 gL⁻¹) no meio de expressão radicular, o material vegetal provinha de árvores adultas da cultivar 'Serr' e clone 'MB-T-231'. Este material manteve-se durante 2 a 3 anos em estufa para reduzir as contaminações *in vitro*. Concluíram que a percentagem de explantes enraizados, assim como o número de raízes primárias por explante, aumentou, quando se reduziu o nível de sacarose de 30 para 15 gL⁻¹. Verificaram também estes autores que um nível baixo de sacarose (15 gL⁻¹) era também o melhor para promover a formação de raízes secundárias.

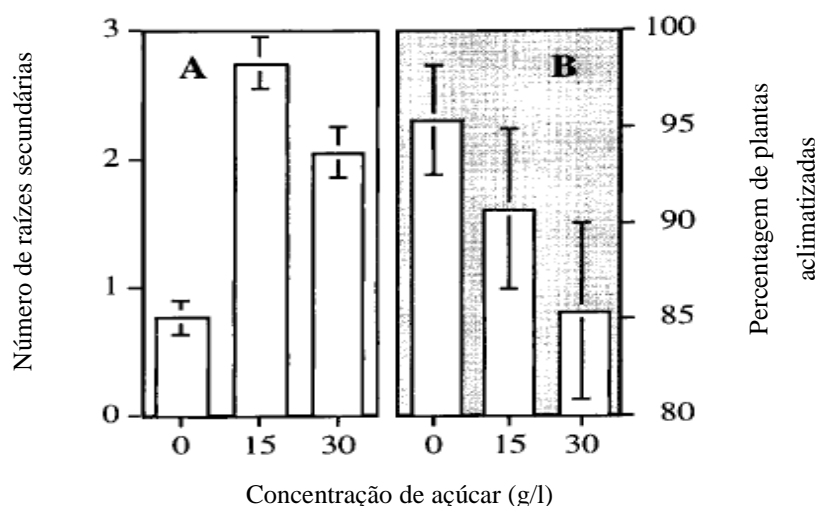


Figura 4. Efeito da concentração de sacarose no meio de expressão no **A)** N° de raízes secundárias por raiz, e **B)** na percentagem de plantas aclimatizadas de *Juglans regia* cv. 'Serr' (Adaptado de Dolcet-Sanjuan et al., 1996)

A utilização de uma concentração mais baixa de sacarose nos meios de enraizamento não é consensual, Peixe (comunicação pessoal) refere que testou no enraizamento do porta-enxertos 'paradox' clone 'Vlach' e da cultivar 'Chandler', o meio DKW, com os macronutrientes reduzidos a ¼ e com concentrações de sacarose de 10, 20, 30 e 40 mgL⁻¹, tendo obtido os melhores resultados com a concentração de 30 mgL⁻¹, a mesma que tinha utilizado durante a fase de multiplicação. Scaltsoyiannes et al., (1997), referem mesmo taxas de enraizamento superiores (95% em várias cultivares de *Juglans regia*), quando utilizaram na fase de expressão do enraizamento o meio DKW gelificado, com

os macronutrientes reduzidos a $\frac{1}{4}$, sem reguladores de crescimento e com 40gL^{-1} de sacarose, valores superiores aos utilizados na fase de multiplicação.

2.3.4.2.3.1.4. Os Reguladores de Crescimento

De um modo geral, a noqueira cultivada *in vitro* parece responder positivamente à aplicação de AIB na fase de indução do enraizamento. No entanto, a concentração utilizada, assim como a duração do período de indução não estão perfeitamente definidas.

Scaltsoyiannes et al., (1997) testaram, na fase de indução, em dois clones (P₃ e P₇) de *Juglans regia* L. o efeito da duração da exposição à auxina AIB no escuro, durante 3 e 6 dias. Os resultados obtidos, revelam que o tratamento de 6 dias no escuro, com 5mgL^{-1} de AIB, conduziu a resultados significativamente melhores, que o de 3 dias, tanto nas percentagens de enraizamento, como no número de raízes secundárias em ambos os clones (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da variação da duração do pré-tratamento no escuro, 3 e 6 dias, em dois clones de *Juglans regia* (Adaptado de Scaltsoyiannes et al., 1997)

Clone	Enraizamento (%)	Comprimento total da raiz (cm)	Raiz secundária
P3 (3 dias)	35±11	7.36±2.7	Poucas
P3 (6 dias)	90±6.7	6.01±1.13	Muitas
P7 (3 dias)	50±11.2	5.4±2.42	Poucas
P7 (6 dias)	65±11.4	7.72±2.63	Muitas

Caboni e Damiano (2006) num ensaio similar onde utilizaram o meio DKW com $\frac{1}{4}$ dos macronutrientes e suplementado com 5mgL^{-1} de AIB, obtiveram os melhores resultados com a colocação dos explantes no escuro por 5 dias. Já Leal et al., (2007) obtiveram os melhores resultados com um período de indução no escuro de apenas 3 dias.

Os resultados obtidos indicam portanto, que a fase de indução em condições de ausência de luz é essencial para a indução do enraizamento em noqueira cultivada *in vitro*, mas, a duração deste tratamento, tem de ser adaptada caso a caso.

2.3.4.2.3.2. Subfase de Expressão Radical

Nesta fase, devem ser dadas aos explantes as condições adequadas para que os primórdios radicais neoformados se desenvolvam e possam resultar no aparecimento

das novas raízes. De um modo geral, o processo pode ser conduzido em condições *in vitro*, mais próximas daquelas em que decorreu a subfase de indução, ou *in vivo/ ex vitro*, em condições mais próximas daquelas que a planta vai encontrar durante a fase de aclimatização. A escolha de um, ou outro processo, tem que ver com a resposta das espécies à presença de auxinas no meio, após a indução, e à sua maior ou menor sensibilidade de adaptação a mudanças mais ou menos drásticas nas condições de desenvolvimento, em especial do tipo de substrato e da humidade relativa do ar.

Relativamente às auxinas, é sabido que, de um modo geral, após um efeito positivo durante a fase de indução, o seu contacto prolongado com o explante inibe o posterior desenvolvimento radical, especialmente nas espécies difíceis de enraizar, como é o caso da noqueira (Caboni et al., 1999 citados por Dolcet-Sanjuan et al., 1999).

A informação disponível para *Juglans* sp. sobre esta subfase do enraizamento, é significativamente mais escassa do que a existente para a subfase de indução. Ripetti et al., (1994) obtiveram os melhores resultados utilizando como meio de expressão a formulação DKW, sem reguladores de crescimento, adicionada de vermiculite e solidificada com Gelrite (Vahdati, 2004). Scaltsoyiannes et al., (1997) transferiram explantes de *Juglans regia* L. com 4 a 5 cm, de dois clones que designaram por P3 e P7, para um meio de expressão usando dois tipos de granulometria de vermiculite (média - I e fina - II) (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito da granulometria da vermiculite (tipo I e II) no enraizamento de clones de *J.regia* P₃ e P₇, no meio DKW (1/4 dos macronutrientes) sem hormonas (Adaptado de Scaltsoyiannes et al., 1997)

Clone	Enraizamento (%)	Comprimento total da raiz (cm)	Raízes secundárias
P3 (II)	40±10.9	6.04±1.13	Poucas
P3 (I)	95±4.9	17.6±2.71	Muitas
P7 (II)	55±11.1	5.14±2.08	Poucas
P7 (I)	70±10.2	7.41±1.99	Muitas

Estes autores observaram que, entre os dois tipos de vermiculite testados, a granulometria média da conduzia a um melhor enraizamento dos explantes e a uma melhor qualidade do sistema radical.

Procurando confirmar a importância da utilização de vermiculite nos meios de expressão do enraizamento, Tetsumura et al., (2002) transferiram após a fase de

indução, explantes da cultivar ‘Japanese pear’ para meio de enraizamento DKW com uma concentração ¼ sem reguladores de crescimento, com ou sem vermiculite.

Tabela 7. Influência do genótipo e do tipo de substrato, na percentagem de enraizamento, no nº de raízes primárias e secundárias, após 30 dias em cultura (Adaptado de Tetsumura et al, 2002)

Cultivar	Substrato	Enraizamento (%)	Nº de raízes primárias por explante	Raízes secundárias (%)
Bansyun	Gelrite	3	1.0±0.0	0±0
	Gelrite + vermiculite	13	1.2±0.1	83±14
Nan-an	Gelrite	0	-	-
	Gelrite + vermiculite	47	2.1±0.4	54±3
Seiko	Gelrite	7	1.5±0.0	0±0
	Gelrite + vermiculite	37	2.8±0.7	58±4

Dos resultados observados, verifica-se que a adição de vermiculite ao meio de cultura DKW com os macronutrientes concentrados a ¼ e sem reguladores de crescimento, melhora as percentagens de enraizamento e promove o desenvolvimento de um bom sistema radical, com um maior número de raízes principais e secundárias formadas (Tabela 7).

Leal, et al., (2007) propõem após a indução radicular no escuro, um período de expressão radicular durante 27 dias com um fotoperíodo de 16 horas em meio DKW com uma diluição dos macronutrientes a 25%, adicionado de vermiculite e perlite numa proporção de (220/250 v/v) e solidificado com Phytigel (Sigma ®).

Parece pois que temos na nogueira uma solução intermédia entre a expressão *in vitro* e *in vivo*. Devido à elevada sensibilidade da espécie à transferência para fora das condições de humidade elevada, existente nos recipientes de cultura *in vitro*, mantêm-se os explantes nestas condições, mas, procura adaptar-se o sistema radical a condições mais próximas das que a planta vai encontrar na fase de aclimatização, com a introdução da vermiculite/perlite nos meios de cultura.

2.3.4.2.4. Aclimatização

É nesta fase que se promove a transição das jovens plantas da condição heterotrófica para a autotrófica. A principal preocupação é a de diminuir ao máximo, as perdas que frequentemente ocorrem por desidratação dos tecidos da planta (Conger, 1980) no entanto, outros fatores, como a suscetibilidade a doenças e a qualidade do sistema radical formado, podem tornar difícil a aclimatização das jovens plantas (Paygahzadeh e Kazemitabar, 2011).

A composição adequada dos substratos também é importante, pois o emprego de vermiculite, tufa ou perlite, isoladamente ou na mistura de diferentes proporções pode resultar em alterações significativas nos índices de sobrevivência (George e Sherrington, 1984).

Segundo Leal et al., (2007), o meio DKW com os nutrientes reduzidos a $\frac{1}{4}$, misturado com vermiculite e perlite (220/250 V/V) e solidificado com Phytigel ®, é o mais adequado para esta fase.

George e Sherrinton (1984), também referem a importância da redução dos sais no meio DKW, neste caso, para metade e acrescentam que, esta deve ser acompanhada por uma redução dos níveis de hidratos de carbono. Segundo estes autores, estas modificações do meio beneficiam a indução de raízes e facilitam o processo de aclimatização.

Shubler et al., (2001), citados por Rupam et al., (2008), referem uma melhoria na sobrevivência de clones de *Juglans regia* na fase pós-aclimatização, através da inoculação dos explantes com micorrizas de uma grande variedade de fungos do filo Glomeromycota. Estes autores observaram taxas de sobrevivência no campo, na ordem dos 80% para as plantas micorrizadas, em contraste com os 20% de sobrevivência do controlo. Segundo eles, a elevada sobrevivência conseguida, pode estar relacionada com o facto de a inoculação com o fungo, ter sido efetuada nas fases iniciais de crescimento da planta, ainda durante a aclimatização, promovendo o desenvolvimento de um sistema radical mais completo e eficiente, na sua capacidade para absorver água e nutrientes, reduzindo assim a chamada crise de transplantação.

3. Material e Métodos

3.1. Material vegetal

Nos ensaios realizados, utilizaram-se explantes do porta-enxerto ‘Paradox’, clone ‘Vlach’, e da cultivar ‘Chandler’. Os explantes iniciais encontravam-se já em cultura asséptica tendo sido instalados e multiplicados *in vitro* de acordo com o procedimento descrito por Lopes (2011).

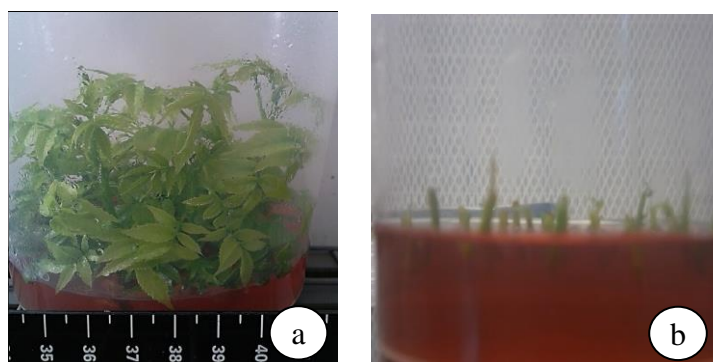


Figura 5. a) Explantes no fim de 30 dias; b) Explantes após a repicagem (Foto do autor, 2014).

Dos rebentos produzidos por esse material inicial (Figura 5 a), foram retirados explantes da zona apical, com 3-5 cm e 3 a 4 folhas expandidas, que foram utilizados nos primeiros ensaios de enraizamento. Todo o remanescente desses rebentos, assim como alguma rebentação axilar existente, foi fragmentado em explantes com 1 entrenó e 1 gomo (Figura 5 b), e utilizado para reiniciar a multiplicação, manteve-se o procedimento de Lopes (2011), de forma a possibilitar a produção de novos explantes, destinados às repetições que foram realizadas em cada um dos ensaios.

3.1.1. Materiais e procedimentos relativos ao processo de cultura *in vitro*

Os instrumentos de manipulação e inoculação do material vegetal foram esterilizados diariamente, através da imersão em etanol 70° durante pelo menos 1 minuto e posterior passagem pelo esterilizador de esferas de vidro a 250 °C. O etanol a 70° foi também utilizado diariamente para desinfecção das mãos dos operadores e das superfícies de trabalho.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121,1 °C antes da sua distribuição. O tempo de esterilização foi variável (20-60 minutos), em função do volume de meio existente nos recipientes a esterilizar.

O material de vidro utilizado, para apoio à manipulação do material, foi esterilizado em estufa, a 180 °C, durante 120 minutos.

Toda a manipulação dos explantes, nas fases de multiplicação e de indução radical, assim como a distribuição dos meios nos recipientes de cultura, foi efetuada em condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar horizontal.

3.2. Condições de cultura

3.2.1. Meios de cultura *in vitro* e repicagens

O meio de cultura utilizado na fase de multiplicação, de acordo com o proposto no protocolo previamente desenvolvido por Lopes (2011), tanto para o clone ‘Vlach’, como para a cultivar ‘Chandler’, foi o meio basal DKW, com micronutrientes 1,5x, adicionado de 1mgL⁻¹ de BAP, 0,01 mgL⁻¹ de AIB, 30 gL⁻¹ de sacarose, 200mgL⁻¹ de caseína hidrolisada e 2,5 gL⁻¹ de Phytigel®. O ferro utilizado foi EDDHA Ferric com 96mgL⁻¹, sendo o pH ajustado a 5,5 antes da autoclavagem.

Os explantes permaneceram neste meio entre 20 e 30 dias, dependendo das taxas de crescimento conseguidas, sendo depois separados os melhores rebentos para passarem à fase de indução radicar, utilizando-se os restantes para reiniciar a fase de multiplicação, de acordo com o procedimento já referido em 3.1.

No que diz respeito aos meios de indução radical, tiveram como base a bibliografia consultada e, a sua formulação, foi diferente para o clone ‘Vlach’ e para a cultivar ‘Chandler’.

Para o ‘Vlach’ utilizou-se o meio DKW com ½ macronutrientes, adicionado de 3mgL⁻¹ de IBA, 30 gL⁻¹ de sacarose, 100 mgL⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,5 gL⁻¹ de Phytigel® e o ferro foi EDDHA Ferric com 96 mgL⁻¹.

Na cultivar ‘Chandler’ utilizou-se o meio MS, com 30 gL⁻¹ de sacarose, 3 gL⁻¹ de Phytigel, 100mgL⁻¹ Myo-inositol sem a utilização de caseína o ferro utilizado foi Fe-EDTA com 96 mgL⁻¹. Nos ensaios de indução radical, em ‘Chandler’, foram testadas diferentes concentrações de AIB 3;5;10 e 15mgL⁻¹.

De um modo geral os explantes permaneceram nos meios de indução por um período de 7 dias. Num dos ensaios realizados, o tempo de indução foi no entanto uma das variáveis em estudo, tendo os explantes sido mantidos no meio de indução por 5, 7, 9, 10 e 12 dias.

O meio de expressão radicular utilizado foi o meio DKW com $\frac{1}{4}$ macronutrientes, 100 mgL^{-1} de caseína hidrolisada e $2,5 \text{ gL}^{-1}$ de Phytigel® o ferro foi EDDHA Ferric com 96 mgL^{-1} .

3.2.1.1. Substratos e procedimentos de enraizamento e aclimatização

Na fase de expressão radical os explantes foram colocados em substratos orgânicos e inorgânicos, - Jiffy Preformas®, - pastilhas de turfa prensada, - cubos de lã de rocha, - vermiculite. Estes substratos foram colocados em recipientes de cultura, como se apresenta na figura 6, sendo que, num recipiente, era possível colocar 8 Jiffy Preformas®, ou 8 pastilhas de turfa prensada, ou 8 de cubos de lã de rocha, ou 200ml de vermiculite (nº2).

As Jiffy Preformas® já vinham humedecidas do fabricante com um meio gelatinoso cuja fórmula não nos foi revelada. Quanto os restantes substratos, foram humedecidos antes da colocação dos explantes, com o meio DKW de expressão radical, cuja formulação foi descrita em 3.2.1.

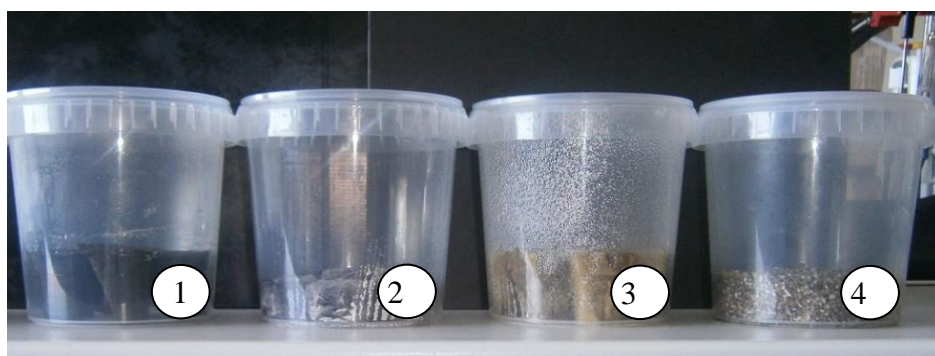


Figura 6. Fase de expressão radicular com os quatro tratamentos; 1-Jiffy Preformas®; 2-Pastilhas de turfa; 3- Cubos de lã de rocha; 4- Vermiculite. (Foto do autor, 2013).

Após 30 dias nestes substratos e nas condições descritas em 3.2.2 os explantes enraizados passaram para a fase de aclimatização. As plantas passaram então para pequenos alvéolos individuais com $5 \times 5 \times 5 \text{ cm}$, que foram cheios com uma mistura de vermiculite nº2. As plantas enraizadas nas Jiffy Preformas®, nas pastilhas de turfa prensada e nos cubos de lã de rocha, foram transferidas de raiz protegida, enquanto as enraizadas em vermiculite foram transferidas de raiz nua, pois o método não possibilita a sua transferência de raiz protegida.

Num dos ensaios realizados comparou-se o efeito da transferência dos explantes para substrato de aclimatização simples e para o mesmo substrato adicionado de uma mistura

de fungos micorrízicos arbusculares do tipo *Glomus* sp. (*G. etunicatum*, *G. claroideum* e *G. intraradices*), fornecido pela empresa da Alemanha INOQ GmbH.

3.2.2. Condicionamento ambiental

Em todas as fases do processo as culturas foram mantidas em equipamentos onde era possível controlar com precisão a temperatura, a humidade, o fotoperíodo e a intensidade luminosa.

Na fase de multiplicação as culturas foram colocadas numa sala de cultura *in vitro* com uma temperatura de 24 °C dia e 22 °C noite, um fotoperíodo de 16 horas e uma intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Na fase de indução radicular as culturas foram mantidas no escuro a uma temperatura constante de 22 °C. Para iniciar a fase de expressão radicular as culturas foram transferidas para câmaras de crescimento de plantas onde se manteve uma temperatura de 24 °C dia e 22 °C noite, um fotoperíodo de 16 horas e uma intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Já na fase de aclimatização as plantas passam para uma sala de climatização com uma temperatura de 21 °C com uma humidade de 80% e permanece nas primeiras 24 horas no escuro, no final deste tempo passam para a luz com uma intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após a aclimatização as plantas com 10-15 cm, foram transferidas para uma estufa de produção.

3.3. Delineamento experimental e análise de dados

Ensaio 1

Objetivo: *Otimização das condições de expressão radical e aclimatização do porta-enxerto 'Vlach'*

Para otimizar as condições de expressão radical foram testados 3 substratos até agora não referidos na bibliografia como opção em *Juglans* sp.:

1-Jiffy Preformas®, 2-Pastilhas de turfa prensada, 3-Cubos de lã de rocha.

Estes substratos, que permitem o transplante com raiz protegida na passagem para a fase de aclimatização das plantas, foram comparados com um controlo, a vermiculite humedecida, vulgarmente utilizada neste processo, mas em que o transplante tem de fazer-se forçosamente de raiz nua.

A preparação dos substratos decorreu como exposto em 3.2.1.1.

O ensaio seguiu um delineamento em blocos causalizados e foi repetido 3 vezes no tempo, com intervalos de aproximadamente 30 dias. Em cada repetição de cada tratamento foi avaliado o comportamento de 96 explantes, correspondendo a 12 recipientes de cultura, cada uma com 8 explantes. Os 12 recipientes de cada tratamento foram divididos aleatoriamente em grupos de 4 e estes grupos distribuídos aleatoriamente na sala de cultura. No final de cada repetição foram registadas as taxas de enraizamento e o conjunto dos dados que foram submetidos a uma análise de variância e a um teste de comparação de médias (Fisher_LSD), onde se considerou um nível de significância para $p \leq 0.05$.

Com o objetivo de otimizar as condições de aclimatização, os explantes enraizados em cada um dos substratos anteriores passaram para tabuleiros com vermiculite, com e sem adição de micorriza, de acordo com o exposto 3.2.1.1.

O processo de climatização decorreu durante 30 dias e no final foram registadas as taxas de sobrevivência das plantas. Pelo facto de o nº de plantas enraizadas obtidas nos 4 tratamentos testados na fase de indução ter sido bastante variável, não foi possível submeter os dados relativos à sobrevivência na aclimatização a qualquer tipo de tratamento estatístico.

Ensaio 2

Objetivo: *Otimização do processo de indução radical na cultivar 'Chandler'*

Este ensaio desenvolveu-se em duas fases. Na primeira, procurou otimizar-se a concentração de auxina (AIB) e, na segunda, o tempo de indução do enraizamento.

Os níveis de AIB utilizados e os tempos de contato, estão descritos em 3.2.1.

Em ambas as fases os ensaios seguiram um delineamento fatorial completo.

Na primeira; 1 cultivar x 4 níveis de AIB x 3 repetições.

Na segunda; 1 cultivar x 2 níveis de AIB x 5 tempos de contato x 3 repetições

Em ambos os casos utilizaram-se 9 caixas de cultura por nível do fator em estudo, cada uma com 15 explantes, correspondendo a uma avaliação de 135 explantes por tratamento/repetição. As repetições foram efetuadas com intervalos de aproximadamente 30 dias.

No final de cada repetição os explantes passaram para Jiffy Preformas® (substrato com o qual se obtiveram os melhores resultados no ensaio 1), de acordo com o procedimento descrito em 3.2.1.1. Os explantes permaneceram aí durante 30 dias, sendo no final registadas as taxas de enraizamento. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise

de variância e a um teste de comparação de médias (Fisher_LSD), onde se considerou um nível de significância para $p \leq 0.05$.

Nos dois ensaios a análise de dados foi efetuada recorrendo ao *software* STATISTICA 8.0™.

4.Resultados e Discussão

4.1 Ensaio 1: Otimização das condições de expressão radical e aclimatização do porta-enxerto ‘Vlach’

Tendo sido previamente otimizadas as condições para as fases de multiplicação *in vitro* e de indução radical, para o porta-enxerto ‘Vlach’, procurou-se neste ensaio melhorar as fases de expressão radical e aclimatização das plantas obtidas *in vitro*. O estudo incidiu sobre a utilização de sistemas (substratos) que permitissem o transplante das jovens plantas com raiz protegida, sistemas esses que foram comparados com o procedimento mais comumente descrito na literatura (controlo), em que o transplante é feito de raiz nua.

Os resultados obtidos relativamente às taxas de enraizamento conseguidas em cada um dos substratos, apresentam-se na figura 7.

É possível observar que o enraizamento ocorreu nos quatro tratamentos, mas, o controlo, com uma taxa média de 30%, foi significativamente inferior a qualquer um dos outros substratos testados. Não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos 1 e 2, lã de rocha e pastilhas de turfa, respetivamente, com taxas de enraizamento médias entre os 62-65%. Os melhores resultados, com 78% de enraizamento médio, foram obtidos com a utilização das Preformas Jiffy®.

Os resultados obtidos com o controlo (vermiculite) estão de acordo com os apresentados por exemplo por Tetsumura et al., (2002), quando referem taxas de enraizamento entre 0 e 47% para três diferentes cultivares em dois substratos à base de vermiculite. A comparação com outros autores, dos resultados obtidos com os restantes substratos, não pode efetuada, pois, tanto quanto nos é possível saber, nem o procedimento utilizado, nem os substratos testados, foram alguma vez utilizados.

A figura 8 apresenta o aspeto das plantas enraizadas em cada um dos substratos. Tendo em conta que uma contagem do número e comprimento das raízes seria neste caso um processo destrutivo, a análise relativa à qualidade do sistema radical não foi efetuada,

no entanto, foi possível observar que as plantas enraizadas no substrato 3, apresentavam em relação às demais, duas características importantes para a fase de aclimatização; - a presença de um sistema radical ramificado com inúmeros pêlos radicais e a - manutenção do crescimento do meristema apical do caule.

Como referido em material e métodos, todas as plantas obtidas nos ensaios de expressão radical passaram para aclimatização. Destas, 50% foram inoculadas com fungos micorrizicos do género *Glomus* sp, de acordo com o procedimento descrito em 3.2.1.1.

As plantas estiveram em aclimatização durante 30 dias e as melhores apresentavam nessa altura o aspeto que se mostra na figura 9. As taxas de sobrevivência foram então registadas e os dados recolhidos são apresentados na figura 10.

Como pode ver-se, a melhor sobrevivência correspondeu às plantas provenientes dos substratos Jiffy Preformas ® com 75% e pastilhas de turfa com 45%, em média. Nos outros dois substratos, a taxa de sobrevivência foi apenas residual.

É também possível observar que, em nenhum dos tratamentos, o uso de *Glomus* melhorou substancialmente a sobrevivência, ao contrário do que é referido por outros autores. É o caso de Shubler et al., (2001), citados por Rupam et al., (2008), que referem uma melhoria na sobrevivência de clones de *Juglans regia* na fase de pós-aclimatização, com a inoculação dos explantes com uma grande variedade de fungos do filo Glomeromycota.

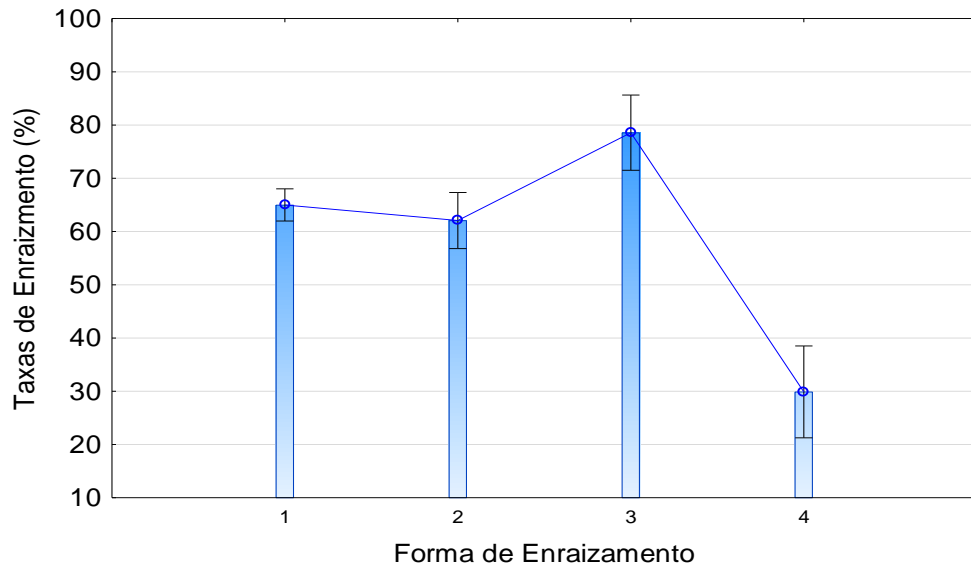


Figura 7. Influência do tipo de substrato nas taxas de enraizamento conseguidas com o porta-enxerto ‘Paradox’ ‘Vlach’. LSD 95%



Figura 8. Enraizamento dos explantes, ao fim de 30 dias. (A) Cubos de lã de rocha, (B) Pastilhas de turfa prensada, (C) Jiffy Ppreformas®, (D) Vermiculite humedecida. (Fotos do autor, 2013).



Figura 9. Planta com 30 dias após a transferência para a fase de climatização. Exemplo de uma planta bem desenvolvida (Foto do autor, 2013).

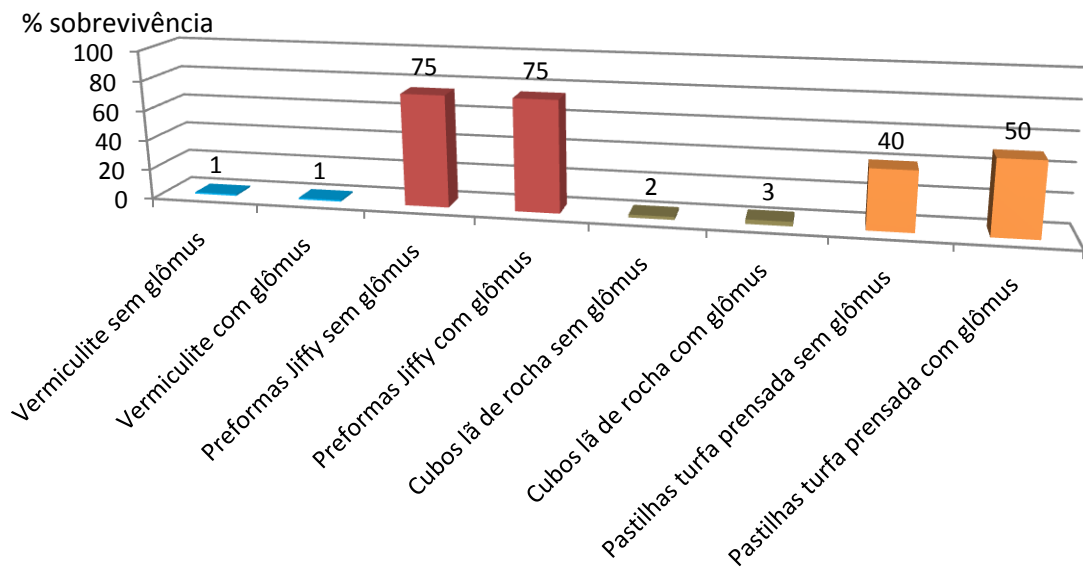


Figura 10. Taxa de sobrevivência observadas em todos os tratamentos realizados.

4.2. Ensaio 2: Otimização do processo de indução radical na cultivar 'Chandler'

Ao contrário do que acontecia para o porta-enxerto 'Vlach', na cultivar 'Chandler', apenas se tinha conseguido sucesso na fase de multiplicação *in vitro*. Todo o processo de indução, expressão radical e aclimatização estava por otimizar.

Assim, numa primeira fase deste ensaio procurou otimizar-se a fase de indução radical. Para isso testaram-se quatro concentrações de AIB durante 7 dias (período de indução).

Os resultados obtidos apresentam-se na figura 11, como se pode ver, a concentração de 3 mg L⁻¹ de AIB, a que é normalmente utilizada no enraizamento de 'Vlach', conduziu a taxas de enraizamento residuais e significativamente inferiores a todas as outras concentrações testadas.

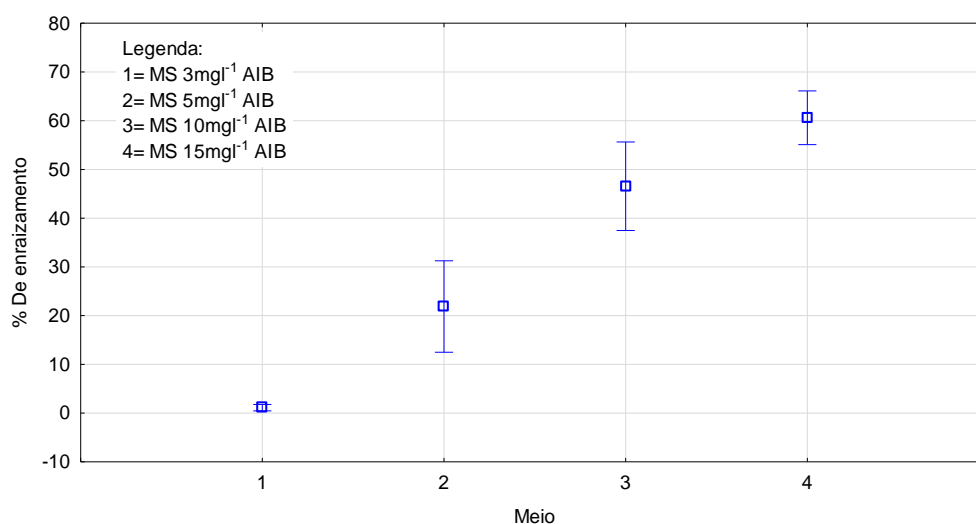


Figura.11. Taxas de enraizamento da cultivar 'Chandler', em diferentes concentrações de AIB, num período de indução radical de 7 dias. LSD = 95%

Com o aumento das concentrações de AIB verificou-se uma subida do enraizamento, tendo o melhor resultado (60%) sido conseguido no tratamento 4, onde se utilizaram 15 mg L⁻¹ de AIB.

Este resultado não foi no entanto significativamente diferente do conseguido com o tratamento 3 (10 mg L⁻¹ de AIB), razão pela qual os dois níveis de reguladores de crescimento se mantiveram em análise comparativa na segunda fase deste ensaio, que seguidamente se descreve.

Nesta fase o objetivo foi o de otimizar o tempo de indução. Utilizaram-se as duas concentrações de AIB que melhores resultados tinham dado na primeira fase (10mgL^{-1} e 15mgL^{-1}) e testaram-se tempos de indução entre 5 e 12 dias.

Os resultados apresentam-se na figura 12. Pode observar-se que os melhores resultados foram obtidos com um tempo de indução de 9 dias e com uma concentração de AIB de 15mgL^{-1} . Este resultado foi significativamente superior a todos os outros, e, para cada conjugação tempo/concentração de AIB, não se observaram diferenças significativas entre a utilização de 10 ou 15 mg L^{-1} . A redução das taxas de enraizamento para os tempos de indução superiores a 9 dias, pode ficar a dever-se a um efeito de toxicidade do AIB.

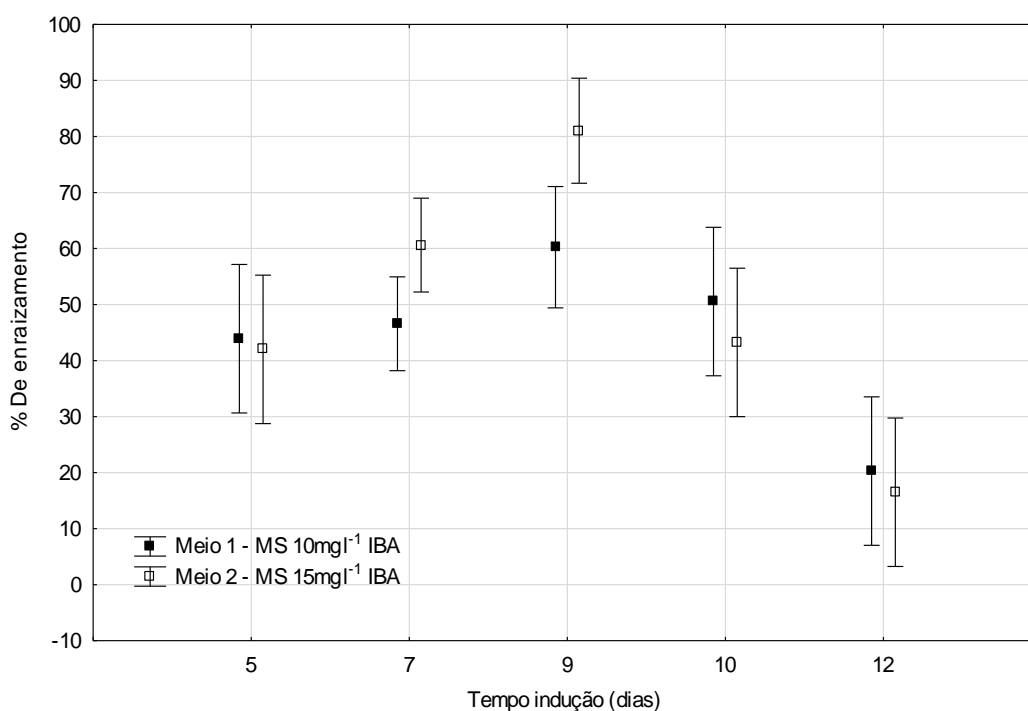


Figura 12. Taxas de enraizamento da cultivar ‘Chandler’ em diferentes tempos de indução utilizado a concentração de 10mgL^{-1} e 15mgL^{-1} de AIB. LSD= 95%

A importância da determinação do tempo ótimo de indução, já tinha sido referida por vários autores, como um elemento fundamental para o sucesso do enraizamento em *Juglans* sp. Caboni e Damiano (2006) num ensaio realizado com a cultivar ‘Sorrento’ e onde utilizaram o meio DKW com $\frac{1}{4}$ dos macronutrientes e suplementado com 5mgL^{-1} AIB, obtiveram os melhores resultados com a colocação dos explantes no escuro por 5 dias. Leal et al., (2007) também trabalhado com *Juglans regia* L., obtiveram os

melhores resultados com um período de indução no escuro de 3 dias, com adição de 4mgL^{-1} de AIB ao meio MS. Tanto um autor como outro, referem que a fase de indução em condições de ausência de luz é essencial para a indução radicular de explantes *in vitro*, e que a duração deste tratamento, tem de ser adaptada caso a caso porque é fortemente influenciada pelo genótipo.

5. Conclusões

Tendo em conta os resultados apresentados, pode concluir-se que objetivos a que nos propusemos foram plenamente atingidos. O trabalho realizado contribuiu significativamente para aumentar o conhecimento técnico a cerca das fases de enraizamento e climatização do clone 'Vlach' e da cultivar 'Chandler', a partir de explantes obtidos por cultura *in vitro*.

Tanto o porta-enxerto 'Vlach' como a cultivar 'Chandler' apresentaram taxas de enraizamento que permitem produção em larga escala. Uma vez que os explantes apresentaram ao longo das repetições, constantes sucessos nas taxas de enraizamento.

Analisando a evolução dos diversos parâmetros mensurados ao longo dos ensaios de indução, pode se concluir que, tanto o tempo de indução, como os diferentes níveis de concentrações de AIB, são de extrema importância para sucesso na fase de indução radicular.

A utilização de substratos que permitem a transferência das plantas com raiz protegida mostrou-se superior ao processo clássico da vermiculite humedecida em que a mudança para aclimatização é feita de raiz nua.

A utilização dos Jiffy Preformas® mostrou-se de extrema importância para o sucesso na climatização. O sistema radicular dos explantes assim enraizados apresenta características qualitativas muito superiores às conseguidas com os outros tratamentos, ainda que a quantificação desta superioridade não tenha sido possível.

Nos ensaios de climatização, tanto com o porta-enxerto 'Vlach' como com a cultivar 'Chandler', verificou-se que os explantes que apresentavam um melhor estado fisiológico, mais longos e com mais folhas por explante, tinham melhor capacidade de climatizar (dados não apresentados).

Foi também possível durante os ensaios, afinar as condições de temperatura e humidade, do ar e dos substratos, que conduzem a melhores resultados em cada uma das fases testadas.

Ainda que, como já referido, pensemos que a presente dissertação contribuiu fortemente para o aumento do conhecimento sobre a micropropagação de nozeiras, a verdade é que muito ainda existe por explorar sobre esta técnica.

6. Bibliografia

- Augé, R., Beauchesne, G., Gibod-Boccon, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Monrand, J., Reynoird, J., Strullu, D., Vidalie, H. (1989). La culture *in vitro* et ses applications horticoles. J.B.Baillière (eds), 57-62.
- Achim, G., e Botu, I. (2001). Results In Walnut Propagation By Using Different Methods. *Acta Horticulturae*, 544, 504-510.
- Amiri, M. E., e Gharati, S. (2012). Influence of medium composition on multiplication of walnut (*Juglans regia* L.) growth. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6:8, 1482-1485.
- Aslamarz, K. V. (2009). Seed and plant Improvement. *HortiScience*, 44:3, 697-701.
- Avanzato, D., and Tamponi, G. (1988). The Effect of Meating of Walnut Graft Unions On Grafting Success. *Acta Horticulturae*, 227, 79-83.
- Barut, E. (2001). Different Whip Grafting Methods on Walnut. *Acta Horticulturae*, 544, 58-72.
- Caboni, E., and Damiano, C. (2006). In Vitro Propagation of Walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Horticulturae*, 705, 329-332.
- Conger V. B, (1981) Cloning Agricultural Plants Via *in vitro*. CRC Press Inc.(eds),11-22.
- Ciudad, A. M.(2014). Flora Iberica . Real Jardín Botánico, CSIC. Plaza de Murillo , Madrid , ESpanha .
- Dolcet-Sanjuan R, Gruselle R, Jay-Allemand C, MeierDinkel A, Gaspar T (1997). Pratical Factors Controlling *in vitro* Adventitious Root Formation From Walnut Shoot Microcuttings. Comission Directorate-general VI, Luxemburg (in press).
- Erdogan, V.(2006). Use of Hot Callusing Cable in Walnut Propagation. Ankara University, Faculty of Agriculture, Departament of Horticulture .
- Franco, J. D. (1971). Nova Flora de Portugal . Lisboa .
- Gandev.S. (2007). Budding and Grafting of the Walnut (*Juglans regia* L.) . *Bulgarium Journal of Agricultural Science*, 13, 683-689 .
- Gandev.S., and Arnaudov. (2011). Propagation Method of Epicotyl Grafting in Walnut (*Juglans Regia* L.) Under Production Condition. *Bulgarium Journal of Agriculture Science*, 173- 176.
- George, F. E., and Sherrington, D. P., 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd, 184-240.
- Gunes, T. (1999). An Investigation on rooting of *Juglans regia* L. Hardwood cuttings . *Tr. J. of Botany*, 367-372.

- Huntrods, D. (2013). nuts. Agricultural marketing resource center .
- INE. (2011). Recenseamento Agrícola 2009 .
- INE. (2013). Estatísticas Agrícolas 2012. Av. António José de Almeida 1000-043 Lisboa Portugal: Instituto Nacional de Estatística.
- Jay-Allemand C, Capelli P, Cornu D. (1992). Root Development of *in vitro* Hybrid Walnut Microcuttings in a Vermiculite-Containing Gelrite Medium. HortiScience, 51, 335-342.
- Lagerstedt, H. (1984). The Hot-Callusing Pipe . Reprinted From Pomona. Publication of North American Fruit Explorers, apring 1984 with permission. .
- Leal, D., Sanchez-Olate, M., Aviles, F., Materan, M., Uribe, M., Hasbun, R., Rodriguez, R. (2007). Micropropagation of *Juglans regia* L. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, 381–390.
- Lopes., M. (2011). Micropropagação in vitro da noqueira (*Juglans regia* L.) por rebentação axilar . Instituto politécnico de Castelo Branco .
- Leslie, C., McGranahan, G (1992). Micropropagation of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). Biotechnology in agriculture and forestry, Berlin Heidelberg, 18, 137-150.
- Marques, D., Dias, J. (2001). *In vitro* shoot culture on *Juglans regia* L. Acta Horticulturae, 544, 251-256.
- McGranahan, G., Catlin. M., Britton, C. (1987). Walnuts book (p. 2), 58-69.
- McGranhan, G. (2007). Micropropagation of Walnut Trees (*Juglans regia* L.) and response to arbuscular mycorrhizal inoculation. Pacific Nut Producer, 13, 639-645.
- McGranahan, G., Leslie, C. (1990). Walnuts (*Juglans*) Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops, HortiScience, 2, 907-951.
- Ozkan, Y., e Gumu, s., A. (2001). Effects of Different Applications on Grafting Under Controlled Conditions of Walnut (*juglans regia* L.). Acta Horticulturae, 544, 72-92 .
- Payghamzadeh, K., Kazemitabar, SK. (2011). *In vitro* Propagation of Walnut. African Journal of biotechnology, 10:3, 290-311.
- Smith, A. F. (s.d.). Historial Virtues of the Walnut . Oxford encyclopedia of food and America , 1.
- Sitton, B. G. (1931). Vegetative Propagation of the Black Walnut. Thesis (Ph.D.)- Michigan State College of Agriculture and Applied Science. Dept. of Horticulture.
- Saadat, Y., e Hennerty, M. (2002). Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). HortiScience 95, 251-260.

- Scaltsoyiannes, A., Tsoulpha, P., Panetsos, KP., Moulalis, D. (1997). Effect of Genotype on Micropropagation of Walnut Trees (*Juglans regia* L.). 46:6, 326-332.
- Sutter, E. G., & Mckenna, j. R. (1995). Clonal Propagation and Nursery Production of Hybrid Walnut Rootstocks. Walnut Research, 53-67.
- Stanisavljevic, M., and Mitrovic, M. (1997). Effect of Variety on Successful Grafting and Development of Nursery Trees of Walnut (*Juglans regia* L.). Acta Horticulturae, 442, 281-284.
- Tetsumura, T., Tsukuda, K., Kawase, K. (2002). Micropropagation of shinano walnut (*Juglans regia* L.). J. Japan. HortiScience, 17, 661-666.
- Vahdati, K., Razaee, R., Mirmasoomi, M. (2009). Micropropagation of Some Dwarf and Early Mature Walnut Genotypes. Biotechnology, 8:1, 171-175.
- Zyl, L. (2009). Grafting of Walnut (*Juglans regia* L.) With Hot Callussing Techniques. Thesis Under South African Conditions . 2.

[http://fruitnuteducation.ucdavis.edu/education/fruitnutproduction/Walnut/Walnut Propagation/](http://fruitnuteducation.ucdavis.edu/education/fruitnutproduction/Walnut/Walnut_Propagation/)