



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Ensaio sobre microenxertia em noqueira (*Juglans regia* L.)

Hugo Miguel Antunes Ribeiro

Orientador(es) | Augusto António Peixe

Maria do Rosário Félix

Évora 2021



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Ensaios sobre microenxertia em noqueira (*Juglans regia* L.)

Hugo Miguel Antunes Ribeiro

Orientador(es) | Augusto António Peixe

Maria do Rosário Félix

Évora 2021



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Augusto António Peixe (Universidade de Évora) (Orientador)
João Manuel Barroso (Universidade de Évora) (Arguente)

A presente dissertação não segue o novo Acordo Ortográfico, por decisão do autor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores e professores Augusto Peixe e Maria Rosário Félix.

À minha filha Diana, à minha companheira Joana, aos meus pais, irmão e avó, a quem este trabalho é dedicado.

O meu profundo agradecimento a Virgínia Sobral, por todos os ensinamentos.

À instituição Universidade de Évora, nomeadamente aos laboratórios de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal e de Virologia Vegetal, os quais me proporcionaram todas as condições para a realização dos trabalhos experimentais.

Quero agradecer também a:

Augusto Ribeiro, Rita Pires e Agustin Tejada.

Professor José Calado, Dra. Clara Serra e Dr. Mysore Sudarshana.

Professor Rui Machado, Isabel Velada, Emanuel Carreira e José Rúpio.

Felicidade Silva, Vicência Charrua e João Cruz.

RESUMO

As técnicas de cultura *in vitro* têm contribuído para a otimização de protocolos de propagação do género *Juglans*. Neste trabalho foi testada a técnica de microenxertia de *J. regia* em híbrido ‘Paradox’. Foi efectuado o enraizamento *ex vitro* em simultâneo com a enxertia. Foi avaliada a influência da presença de folhas no enxerto e no porta-enxerto na taxa de sucesso da técnica, assim como o despiste de *Cherry leaf roll virus*. Verificou-se que a presença de folhas foi um requisito obrigatório para o sucesso da enxertia e do enraizamento. A enxertia apresentou uma taxa média de sucesso de 84,6 % e a taxa de aclimatização aos 60 dias foi 86,4 %. Detectaram-se amostras suspeitas de serem positivas para a presença de *Cherry leaf roll virus*. A técnica de microenxertia apresentada mostrou-se viável tecnicamente e eventualmente com condições de competir com as técnicas tradicionais de enxertia em viveiro.

Palavras-chave:

‘Chandler’, CLRV, Cultura *in vitro*, ‘Paradox’, Propagação

ABSTRACT

Trials about walnut (*Juglans regia* L.) micrografting.

In vitro culture techniques have contributed to the optimization of propagation protocols of the genus *Juglans*. Here the micrografting technique was tested with *J. regia* grafted in a 'Paradox' hybrid. Rooting *ex vitro* was performed simultaneously with grafting. The influence of the presence of leaves on the graft and rootstock on the success rate of the technique was evaluated, as well as the screening of *Cherry leaf roll virus*. It was found that the presence of leaves, in the graft or in the rootstock, or in both, was a mandatory requirement for the grafting success. The grafting success presented a final global average of 84.6% and the acclimatization rate at 60 days was 86.4%. Samples putatively positive for the presence of *Cherry leaf roll virus* were detected. The micrografting technique here presented seems to be technically feasible and maybe able to compete with the traditional techniques of nursery grafting.

Keywords: 'Chandler', CLRV, *In vitro* culture, 'Paradox', Propagation

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Antes de Cristo

AIA - Ácido indol-3-acético

AIB - Ácido-indol-3-butírico

ANA - Ácido 1-naftalenacético

BAP - 6-Benzilaminopurina

°C - Grau centígrado

Ca - Cálcio

c-DNA - DNA complementar

cl. - Clone

cm - Centímetro

cv. - Cultivar

CLRV - *Cherry leaf roll virus*

DAE - Dias após enxertia

DKW - Meio de cultura DKW (Driver e Kuniyuki, 1984)

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs - deoxinucleótidos trifosfatados

EUA - Estados Unidos da América

EDIA - Empresa de Desenvolvimento e Infra-Estruturas do Alqueva

FAS/USDA - *Foreign Agricultural Service/United States Department Agriculture*

Fe - Ferro

FeEDDHA - Acetato de etilenodiamina di-2-hidroxifenil férrico

g - Grama

h - Hora

ha - Hectare

INE - Instituto Nacional de Estatística

K - Potássio

Ki - Cinetina

L - Litro

M - Molar

Mg - Magnésio

m - Metro

m² - Metro quadrado

mg - Miligrama
ml - Mililitro
mM - Milimolar
mm - Milímetro
MS - Meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962)
Na - Sódio
ng - Nanograma
NPK - Azoto, Fósforo, Potássio
PCR - Reacção em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)
PPM - *Plant Preservative Mixture*
pb - Pares de bases
RNA - Ácido ribonucleico
RT-PCR - Transcrição reversa seguida da reacção em cadeia da polimerase
s⁻¹ - Segundo
TDZ - Tiazurão
ton/ha - Toneladas por hectare
U - Unidades
UC - Universidade da Califórnia
UE - União Europeia
V - Volt
W - Watt
WPM - Meio de cultura WPM (Lloyd e Mc Cownl, 1981)
2,4 D - Ácido 2,4- diclorofenoxiacético
µl - Microlitro
µM - Micromolar
µmol - Micromole

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE GERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A Cultura da Nogueira no Mundo e em Portugal	3
2.1.1. Enquadramento da produção no mundo	3
2.1.2. Evolução da área e da produção em Portugal.....	4
2.2. <i>Juglans regia</i> L. – Origem, Classificação Taxonómica e Caracterização Botânica	6
2.2.1. Centro de origem	6
2.2.2. Classificação taxonómica	6
2.2.3. Caracterização botânica.....	6
2.3. Cultivares e Melhoramento	7
2.3.1. A cultivar ‘Chandler’	9
2.4. Porta-enxertos no género <i>Juglans</i>	9
2.4.1. Porta-enxertos de origem seminal	10
2.4.1.1. <i>Juglans regia</i> L.....	10
2.4.1.2. O grupo das nogueiras negras.....	10
2.4.1.3. Porta-enxertos híbridos.....	11
2.4.2. Porta-enxertos clonais	11
2.4.2.1. Selecção e Melhoramento dos híbridos ‘Paradox’	11
2.4.3. Problemas fitossanitários associados ao uso das nogueiras negras e seus híbridos como porta-enxertos do género <i>Juglans</i>	13
2.5. Propagação em <i>Juglans</i> sp.	14
2.5.1. Propagação por via seminal.....	14
2.5.2. Propagação vegetativa	15
2.5.2.1. Técnicas tradicionais	15
2.5.2.1.1. Estacaria	15

2.5.2.1.2. Enxertia.....	16
2.5.2.2. Propagação <i>in vitro</i>	20
2.5.2.2.1. Microestacaria	20
2.5.2.2.1.1. Estabelecimento da cultura em assepsia.....	20
2.5.2.2.1.2. Multiplicação	21
2.5.2.2.1.3. Alongamento	23
2.5.2.2.1.4. Enraizamento	24
2.5.2.2.1.4. Aclimatização	27
2.5.2.2.2. Microenxertia	29
2.6. Influência da presença de gomos e folhas no processo de formação de raízes adventícias e na formação das ligações vasculares na enxertia	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Materiais.....	34
3.1.1. Material Vegetal	34
3.1.2. Meios de cultura	34
3.1.3. Substratos/contentores de multiplicação, enraizamento e aclimatização .	34
3.2. Métodos.....	35
3.2.1. Preparação dos meios de cultura <i>in vitro</i>	36
3.2.2. Esterilização e desinfecção de materiais	36
3.2.3. Condições de cultura	36
3.2.4. Procedimentos de enraizamento, enxertia e aclimatização	37
3.2.5. Detecção de <i>Cherry leaf rol virus</i> em material vegetal de noqueira	40
3.2.5.1. Inoculação mecânica do controlo positivo	40
3.2.5.2. Recolha e preparação das amostras de material vegetal do género <i>Juglans</i>	40
3.2.5.3. Extração do RNA total.....	41
3.2.5.4. Protocolo de RT-PCR para o diagnóstico de CLRV	42
3.3. Delineamento experimental e análise de dados	42
3.3.1. Ensaio I e II.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Ensaio I e II.....	44
4.2. Testes de diagnóstico de <i>Cherry leaf rol virus</i> aplicados ao género <i>Juglans</i> .	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
6. BIBLIOGRAFIA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Material vegetal utilizado na microenxertia: (A) Porta-enxerto do híbrido ‘Paradox’ (<i>J. hindsii</i> x <i>J. regia</i>) cl. ‘Vlach’; (B) Enxerto de <i>J. regia</i> cv. ‘Chandler’.....	34
Figura 2. Substratos orgânicos utilizados na fase de enraizamento. (A) Jiffy® Preformas irradiados V8-Y; (B) Jiffy® Grow Block, Coco RHP.	35
Figura 3. Aspecto da selecção dos explantes da cv. ‘Chandler’ destinados à enxertia. .	37
Figura 4. Aspecto da enxertia em fenda com incrustação de topo da cv.‘Chandler’ com folhas no porta-enxerto cl.‘Vlach’ sem folhas.....	38
Figura 5. Planta microenxertada apresentando pegamento do enxerto e raízes.	39
Figura 6. Plantas envasadas e aclimatizadas no fim dos ensaios, aptas a prosseguir para condições de estufa.	40
Figura 7. Comparação do sucesso da enxertia nos diferentes tratamentos do ensaio I. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogêneos para $p \leq 0,05$	44
Figura 8. Comparação do sucesso do enraizamento nos diferentes tratamentos do ensaio I. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogêneos para $p \leq 0,05$	47
Figura 9. Comparação do sucesso da aclimatização aos 60 DAE nos diferentes tratamentos no ensaio I. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogêneos para $p \leq 0,05$	48
Figura 10. Comparação do sucesso da enxertia nos diferentes tempos no ensaio II. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogêneos para $p \leq 0,05$	50
Figura 11. Comparação do sucesso da aclimatização aos 30 DAE nos diferentes tempos no ensaio II. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos	

após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogêneos para $p \leq 0,05$	51
Figura 12. Em destaque, os sintomas de infecção com CLRV com necroses localizadas no limbo das folhas de <i>N. benthamiana</i>	53
Figura 13. Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de isolados de CLRV: 21-CLRV,22-Nb, CN- Controlo negativo de PCR.M – ‘DNA Ladder 1kb plus’ (GIBCOBRL). A seta indica a banda correspondente ao produto de amplificação esperado (431 pb).	53
Figura 14. Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de isolados de CLRV:1-CVE1, 2-CAP,3-CV1, 4-VV1, 5-CVP1, 6- CVP2, 7-CVE2, 8-CAP2, 9-CV2, 10-VV2, 11-CVP3, 12- CVE3, 13-CAP3, 14- CV3, 15-CVE4, 16-CAP4, 21-CLRV,22-Nb, CN- Controlo negativo de PCR. M – ‘DNA Ladder 1kb plus’ (GIBCOBRL). A seta indica a banda correspondente ao produto de amplificação esperado (431 pb).....	55
Figura 15. Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de isolados de CLRV: 17-CV4, 18-VV3, 19- CVP4, 20-VV4, 21-CLRV, 22-Nb, CN- Controlo negativo de PCR. M – ‘DNA Ladder 1kb plus’ (GIBCOBRL).A seta indica a banda correspondente ao produto de amplificação esperado (431 pb).....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estatísticas de produção dos principais produtores mundiais e de Portugal e Espanha (INE, 2019; MAPA, 2020; FAS/USDA, 2019)	3
Tabela 2. Área, produção e produtividade da noqueira em Portugal (INE, 2013, 2017, 2019).....	4
Tabela 3. Comparação da área, produção e produtividade da noqueira em 2008 e 2018 por NUTS II (INE, 2009, 2019).	5
Tabela 4. Material vegetal testado para a presença de CLRV.....	41
Tabela 5. Tratamentos de enxertia com as combinações para a presença ou ausência de folhas	43
Tabela 6. Quantificação de RNA total e razão ácido nucleico/proteína obtidos nas amostras de material vegetal de <i>Juglans</i> sp.....	54
Tabela 7. Resultados para a presença de CLRV no material vegetal de <i>Juglans</i> sp. testado	56

1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A cultura da noqueira-europeia (*Juglans regia* L.) tem suscitado interesse nos últimos anos em Portugal, sobretudo no sul do país, no perímetro de rega associado ao Empreendimento de Fins Múltiplos de Alqueva (EDIA, 2019).

No entanto, a expectativa criada à instalação de novos pomares, tem estado a ser condicionada pela baixa disponibilidade de plantas no sector viveirista, associada aos preços altos de venda. Em 2018, em Portugal, o preço médio de venda de noqueiras dos viveiristas aos agricultores, foi de 10,12 euros, o valor mais elevado de todas as fruteiras consideradas no inquérito à venda de árvores de fruto e oliveiras (INE,2018).

A espécie, difícil de multiplicar por estacaria convencional, obriga à utilização de porta-enxertos, em muitos casos de origem seminal, que, devido ao facto de a espécie ser heterozigótica, dão origem a populações heterogéneas, factor que se reflecte posteriormente na heterogeneidade dos pomares obtidos. Assim, desde os anos 80 que tem sido desenvolvida investigação sobre a possibilidade de utilizar técnicas de cultura *in vitro*, como forma de obtenção de plantas clonais. Trabalhos nesse sentido foram desenvolvidos nos Estados Unidos (Driver & Kuniyuji, 1984; Leslie & McGranahan, 1992), França (Jay-Allemand et al., 1992), Espanha (Lopez, 1999; Moreno et al., 2012), Chile (Leal et al., 2007), Irão (Vahdati et al., 2009) e mais recentemente em Portugal (Carlos, 2014; Peixe et al., 2015). Daqui resultou o desenvolvimento de protocolos mais ou menos otimizados, para a produção *in vitro* de plantas, sobretudo porta-enxertos.

A multiplicação vegetativa de porta-enxertos permite a obtenção de árvores com maior uniformidade, sem as desvantagens associadas à variabilidade de plantas de origem seminal. Mas, se a optimização dos protocolos de cultura *in vitro* permite a multiplicação clonal dos porta-enxertos, os métodos de enxertia ainda estão muito dependentes de técnicas tradicionais. Os processos de enxertia em viveiro e no local definitivo têm associadas várias condicionantes. As falhas no pegamento do enxerto, o tempo de obtenção da planta enxertada, a baixa disponibilidade de mão-de-obra qualificada e a elevada dependência das condições ambientais, são algumas delas.

Do atrás referido se compreende que, para aumentar o sucesso dos processos de propagação da noqueira, é importante melhorar a eficiência das técnicas de enxertia. Na continuidade do trabalho de Carlos (2014), e Peixe et al. (2015), na micropropagação *in vitro* do género *Juglans*, foi objectivo deste trabalho ensaiar a possibilidade de a enxertia ser efectuada em condições de ambiente controlado e numa fase precoce do desenvolvimento das plantas (microenxertia).

Nos ensaios, foi utilizado como enxerto a *J. regia* cv. 'Chandler' e como porta-enxerto o híbrido 'Paradox' (*Juglans regia* x *Juglans hindsii*) cl. 'Vlach', ambos provenientes de plantas produzidas *in vitro*, tendo-se efectuado uma enxertia de fenda cheia de incrustação de topo.

Os ensaios foram delineados de modo a avaliar a influência da presença de folhas nos dois biontes (enxerto e porta-enxerto), na taxa de sucesso da técnica. Para identificar a qualidade do material produzido, foi também efectuado o despiste de *Cherry leaf roll virus* (CLRV).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Cultura da Nogueira no Mundo e em Portugal

2.1.1. Enquadramento da produção no mundo

A noqueira-europeia (*Juglans regia* L.) é cultivada em diferentes regiões do mundo com o objectivo de produção de fruto e madeira. Actualmente é cultivada no hemisfério Norte em países como os Estados Unidos da América (EUA), China, Irão, Turquia, Ucrânia, Roménia ou França, entre as latitudes 30 a 55° e no hemisfério Sul, na Argentina, Chile, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia, entre as latitudes 30 e 40° (Pou, 2012; Vahdati et al., 2019).

As estatísticas de produção mais recentes indicam uma produção mundial de noz de 2 123 487 toneladas, seguindo uma tendência crescente nos últimos dez anos, acompanhando o dinamismo do sector dos frutos secos no comércio internacional (FAS/USDA, 2019; Nutfruit.org, 2020). Em percentagem da produção total, em 2019, a China representou 47 %, os EUA 26,9%, o Chile 7,5%, a União Europeia (UE) 5,8%, a Ucrânia 5,6 % e a Turquia 3% (Tabela 1).

A produção da Península Ibérica é residual no contexto mundial, Portugal e Espanha representam respectivamente, 0,22 e 0,88 % do total no mundo (Tabela1).

Tabela 1. Estatísticas de produção dos principais produtores mundiais e de Portugal e Espanha (INE, 2019; MAPA, 2020; FAS/USDA, 2019).

Origem	Produção (t) e % da produção mundial
China	1 000 000 (47%)
Estados Unidos	571 527 (26,9%)
Chile	160 000 (7,5%)
União Europeia	125 000 (5,8%)
Ucrânia	120 960 (5,6%)
Turquia	65 000 (3%)
Espanha (Mapa 2020)	17 542 (0,82%)
Portugal (INE,2019)	4 734 (0,22%)
Mundo	2 123 487 (100%)

Em 2018 os EUA eram o maior exportador, representando mais de 50 % das exportações mundiais. O Chile é o segundo maior exportador, sendo a maior parte da

produção (mais de 90%) destinada à UE e Turquia. O Chile apresenta a maior taxa de crescimento das exportações a nível mundial (141%), relativamente ao período de referência dos últimos dez anos. Pelo contrário, a China, apesar de ser o maior produtor, tem um papel secundário nas trocas internacionais, pois a maior parte da produção, cerca de 90%, é para consumo interno (nutfruit.org, 2020).

2.1.2. Evolução da área e da produção em Portugal

A produção nacional de noz ronda actualmente as 4 mil toneladas, numa área que tem vindo a crescer gradualmente nos últimos anos, de 2 698 ha em 2010 aumentou para 3 839 ha em 2018 (INE, 2013, 2019) (Tabela 2). A produção portuguesa tem uma contribuição bastante modesta no contexto europeu (inferior a 4%) e mundial (inferior a 0,3%) conforme os dados da Tabela 1. O aumento de área ainda não se reflecte na produtividade mais recente, que se presume ser reflexo das novas áreas plantadas ainda não terem entrado em plena produção (Tabela 2).

Tabela 2. Área, produção e produtividade da noqueira em Portugal (INE, 2013, 2017, 2019).

Ano	Área (ha)	Produção (t)	Produtividade (t/ha)
2010	2698	3350	1,24
2011	2698	3730	1,38
2012	2847	4216	1,48
2013	2922	4609	1,58
2014	2946	4132	1,40
2015	3287	4062	1,24
2016	3315	4315	1,30
2017	3537	4585	1,30
2018*	3839	4734	1,23

*Dados provisórios

As principais áreas de produção localizam-se no Alentejo com 1507 ha e no Norte com 1305 ha. Estes dados comprovam que o Alentejo é a região com maior expansão da cultura e que apresenta a maior área de noqueiras no país (39,2%) (Tabela 3). Há uma subida ligeira da produtividade no país no período entre 2008 e 2018, no entanto, na região do Alentejo, esse aumento ainda não se tinha verificado, porque muitos dos novos pomares ainda não se encontravam em produção. Em 2019, foram inscritos 969 novos

hectares de área de nogueiras nos perímetros de rega de Alqueva (EDIA, 2019). Uma das razões deste aumento é a disponibilidade de novas áreas de regadio, associadas a apoios comunitários, que se reflecte na reconversão de áreas de culturas anuais, menos rentáveis, para áreas com culturas perenes para a produção de frutos secos (Almeida, 2017).

Tabela 3. Comparação da área, produção e produtividade da nogueira em 2008 e 2018 por NUTS II (INE, 2009,2019).

NUTSII	Área (ha)		Produção (t)		Produtividade (t/ha)	
	2008	2018	2008	2018	2008	2018
Continente	3158	3839	3752	4734	1,18	1,23
Norte	1624	1305	1398	1224	0,86	0,93
Centro	846	892	937	948	1,10	1,06
Área Met. Lisboa	81	22	105	31	1,29	1,40
Alentejo	536	1507	1153	2257	2,15	1,49
Algarve	71	112	159	273	2,23	2,43

Em 2005, no plano intervenção para a zona de Alqueva, foi indicada a existência de uma área potencial para a instalação de nogueiras, baseada em critérios relacionados com factores edáficos: solos com espessura superior a 0,45 m, textura mediana a pesada, pH entre 6,5 a 8, com boa drenagem e baixa salinidade (sir.dgadr.gov.pt, 2005). Estas características encontram-se sobretudo em solos, que na classificação portuguesa estão classificados como aluviossolos, calcários, mediterrâneos pardos e vermelhos ou amarelos e ainda os barros. Verifica-se que, apesar da área potencial indicada para nogueira em 2005 ser cerca de 117 000 ha, em 2018 existiam em todo o Alentejo 1507 ha (Tabela 3) isto é, 1,3 % da área potencial. Na actualidade, as áreas plantadas estão abaixo das expectativas criadas à época. Verifica-se então, que a expansão da área de nogueira tem sido gradual, sendo que alguns dos motivos que contribuem para a expansão lenta da cultura, são a pouca disponibilidade de plantas no mercado, os elevados tempos entre a encomenda do cliente e a entrega das plantas pelos viveiristas e os custos altos associados à produção de plantas enxertadas.

A maior parte dos pomares em Portugal são ainda constituídos por árvores cujos porta-enxertos são de origem seminal, com enxertias efectuadas em viveiro, ou já em local definitivo. A obtenção de porta-enxertos clonais por cultura *in vitro* no mundo e em

Portugal (Carlos, 2014) permitiram novas possibilidades para substituir a utilização de material de origem seminal para a enxertia de cultivares californianas como é o caso da cv. 'Chandler'.

Na campanha de 2017/2018, foram vendidas em Portugal 21 874 noqueiras, das quais 9 358 no Norte, 7 423 no Centro e 4 240 no Alentejo e a importação de apenas 330 plantas (INE, 2019). Estes valores de venda, insuficientes para garantir as necessidades das plantações dos últimos anos, indicam a possibilidade de existirem dados insuficientes das declarações de produção e comercialização do sector viveirista.

2.2. *Juglans regia* L. – Origem, Classificação Taxonómica e Caracterização Botânica

2.2.1. Centro de origem

O centro de origem localiza-se na Ásia Central, abrangendo a província de Xinjiang na China até ao Cáucaso. A cultura da noqueira tem estado associada a civilizações euroasiáticas desde a idade do Bronze. Foram identificadas três regiões como os primeiros locais de domesticação da espécie, o próximo Oriente, no Sul da Arménia, (6230 – 5790 AC), a Ásia central, no vale de Caxemira no Paquistão (5149 AC), e a China, na bacia do rio Amarelo (7300 AC). As grandes vias de comunicação asiáticas como a estrada real persa e a rota da seda, permitiram o comércio e dispersão da cultura interligando a China e a Índia à bacia do Mediterrâneo (Pollegioni et al., 2015).

2.2.2. Classificação taxonómica

As noqueiras são plantas lenhosas da classe das dicotiledóneas, pertencem à ordem das *Fagales*, da família *Juglandaceae*, que inclui cerca de cinquenta espécies divididas em onze géneros. Destaca-se o género *Juglans*, que inclui mais de vinte espécies originárias da América e Eurásia integrando-se em três grupos com quatro secções. O grupo das noqueiras cinzentas abrange as secções *Trachycaryon*, *Cardiocaryon*, o grupo das noqueiras negras inclui a secção *Rhysocaryon* e o grupo das noqueiras brancas abrange a secção *Dioscaryon* à qual pertence a espécie *J. regia* de origem euroasiática. Todas as espécies do género *Juglans* são diplóides com $2n = 2x = 32$ cromossomas, sendo que a maioria apresenta a possibilidade de hibridar entre si (Pou, 2012; Bernard et al., 2018).

2.2.3. Caracterização botânica

A espécie *J. regia* é considerada autocompatível sendo todas as cultivares intercompatíveis. É uma planta monóica, sendo que as inflorescências masculinas, os

amentilhos, formam-se nos ramos com um ano de idade, aparecendo geralmente em posição axilar. As flores femininas, solitárias ou reunidas em grupos até cinco, surgem nos raminhos do ano (Ramos & Valério, 2017).

A polinização da espécie é anemófila e de um modo geral apresenta dicogamia (desfasamento temporal da floração masculina e feminina), que pode ocorrer de dois modos, conforme as cultivares. Se a floração masculina surge antes da feminina, classifica-se protandria, no caso contrário, denomina-se protoginia (Pou, 2012; Ramos & Valério, 2017). A dicogamia é do ponto de vista da produção comercial uma desvantagem, uma vez que implica a utilização de cultivares polinizadoras, com datas de floração masculina coincidentes com as datas da floração feminina das cultivares de produção.

Existem dois hábitos de frutificação. O primeiro é o tipo apical ou subapical com a frutificação localizada na posição terminal dos ramos. No segundo caso, a frutificação ocorre ao longo do ramo em posição lateral (Ramos & Valério, 2017). O primeiro é o mais vulgar, característico das cultivares tradicionais euroasiáticas, o segundo é mais raro, mas mais interessante do ponto de vista da produção. O hábito de frutificação lateral é uma das características de interesse mais importantes utilizadas nos programas de melhoramento das cultivares da Califórnia, uma vez que tem influência directa na produtividade (Tulecke & McGranahan, 1994; Bernard et al., 2018).

2.3. Cultivares e Melhoramento

As actuais cultivares de *J.regia* com o objectivo de produção de fruto, são resultantes de quatro grandes fases de trabalhos de melhoramento em diferentes locais do mundo. Vadhati et al. (2019) apresentam-nas temporalmente nas seguintes sequências; 1700–1948, 1948–1979, 1979–2009 e de 2009 até à actualidade.

O primeiro período iniciou-se em França com o desenvolvimento de técnicas de enxertia e selecção de cultivares como a ‘Franquette’, ‘Mayette’, ‘Crone’, ‘Grandjean’ ou a ‘Parisienne’. O melhoramento na Califórnia iniciou-se com a introdução das cultivares francesas e de germoplasma importado dos centros de origem como o Irão e o Afeganistão. Destaca-se o trabalho de Felix Gillet e Josef Sexton. Nesta época surgem as cvs. ‘Eureka’, ‘Waterloo’, ‘Poe’ e ‘Hartley’ (Vadhati et al., 2019).

George Payne, um agricultor californiano, descobriu no seu pomar uma árvore com características de elevada produtividade associada a hábitos de frutificação lateral, a partir daí foi seleccionada a cv. ‘Payne’, que durante o século XX se tornou a base do

melhoramento da noqueira da Universidade da Califórnia em Davis (Tulecke & McGranahan, 1994).

Os principais objectivos desta 1ª fase eram melhorar características associadas ao calibre, rendimento de miolo, e obtenção de casca fina.

O segundo período na Califórnia está relacionado com o trabalho de Serr e Forde entre 1948 e 1979, com a utilização em cruzamentos das cultivares francesas com germoplasma de material recolhido nos centros de origem na Ásia Central. Os principais objectivos desta fase foram a obtenção de características associadas ao abrolhamento tardio, frutificação lateral, produção precoce, vigor médio e tolerância a doenças. São deste período as seguintes cultivares, ‘Midland’, ‘Vina’, ‘Pioneer’, ‘Pedro’, ‘Amigo’, ‘Chico’, ‘Serr’, ‘Chandler’, ‘Howard’ e ‘Sunland’. Em França, o programa de melhoramento foi dirigido por Eric Germain no *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) com a utilização de cruzamentos entre cultivares francesas e californianas. A cv. ‘Lara’ desce da cv. ‘Payne’, serviu como principal progenitor nos cruzamentos. Por exemplo, o cruzamento entre as cvs. ‘Franquete’ e ‘Lara’ resultou no lançamento da cv. ‘Fernor’.

As 3ª e 4ª fases correspondem respectivamente, ao período entre 1979 a 2009 dirigido por Gale McGranahan e Charles Leslie e ao período entre 2009 até a actualidade, liderado por Charles Leslie.

Na Califórnia, na 3ª fase os principais objectivos foram a obtenção de cultivares com colheita precoce, tolerância à doença da linha negra associada ao *Cherry leaf roll virus* (CLRV) e ausência de abscisão do pistilo da flor *pistillate flower abscission* (PFA). As principais cultivares lançadas foram a ‘Tulare’, ‘Robert Livermore’, ‘Sexton’, ‘Gillet’ e ‘Forde’. Nesta fase foram utilizadas ferramentas de biologia molecular, como marcadores moleculares associados ao melhoramento clássico.

Na 4ª fase, os principais objectivos definidos continuam a ser a data de colheita precoce, elevada produtividade e resistência ao CLRV, tendo sido lançadas as cvs. ‘Ivanhoe’, ‘Solano’ e ‘Durham’. Este período é caracterizado pela utilização de técnicas de biotecnologia como mapeamento genético ou a sequenciação do genoma da espécie *J. regia*. Em França, o programa continuou com alguma irregularidade, destacando-se o lançamento de cultivares como a ‘Ferjean’, ‘Feradam’, ‘Ferbel’, ‘Ferouette’ e ‘Fertignac’.

Paralelamente às fases mais recentes dos programas franceses e americanos, países como a China, a Turquia e o Irão, países com uma elevada diversidade genética, coincidente com os centros de origem da espécie, iniciaram os seus projectos de

melhoramento, que são baseados na identificação e selecção de características de interesse existentes no elevado número de cultivares tradicionais (Vahdati et al., 2019).

2.3.1. A cultivar ‘Chandler’

A cv. ‘Chandler’ foi obtida através de um cruzamento efectuado por Serr e Forde em 1963 entre as cvs. ‘Pedro’ e ‘56-224’, sendo patenteada e lançada no mercado pela UC Davis em 1979. É uma variedade produtiva com frutificação lateral com algum vigor, frutificando bem na presença de cultivares polinizadoras como a cv. ‘Franquette’. É na actualidade a variedade mais utilizada na Califórnia, representando $\frac{3}{4}$ da produção sendo ainda a mais importante oriunda do programa de melhoramento americano (Tulecke & McGranahan, 1994; Bernard et al., 2018).

Nos dados de 2017, a Califórnia, local de referência da produção da cultura, apresenta uma produção média de 4,87 ton/ha numa área produtiva de 141 639 ha, onde cerca de 48 % desta área corresponde à cv. ‘Chandler’ (Nass.usda.gov, 2018).

Esta cultivar encontra-se em expansão em Espanha, no Chile e actualmente em Portugal (Pou, 2012, Aletà & Abelló, 2020).

Com o aumento da área disponível de regadio no Alentejo e com a intensificação das técnicas culturais dos novos pomares, também do ponto de vista das cultivares há uma mudança no paradigma da utilização de cultivares californianas mais produtivas como é o caso da cv. ‘Chandler’ em detrimento das portuguesas e francesas (EDIA,2019).

Cerca de 80 % das novas áreas plantadas nos últimos 10 anos na Península Ibérica correspondem a esta cultivar. A expansão para novas áreas tem alguns problemas associados, que correspondem por vezes a localizações desenquadradas, como por exemplo, em relação às exigências relativas às horas de frio da cultivar. Também a intensificação monocultural, acarreta maiores dificuldades na gestão de pragas e doenças e na logística associada às datas de colheita, processamento e venda da noz (Aletà & Abelló, 2020).

2. 4. Porta-enxertos no género *Juglans*

Os porta-enxertos utilizados para a cultura da noqueira europeia podem ser de origem seminal ou clonal e ter três origens distintas; - a noqueira europeia *J.regia*, - o grupo das noqueiras negras, - o grupo dos híbridos de *J. regia* cruzados com noqueiras negras. Todos apresentam vantagens e desvantagens em função das características dos locais de plantação (Catlin, 1998; Pou, 2012; Ferreti et al., 2017).

2.4.1. Porta-enxertos de origem seminal

2.4.1.1. *Juglans regia* L.

Tradicionalmente as noqueiras eram obtidas por reprodução sexuada. No início do século XX começaram-se a utilizar as técnicas de enxertia em porta-enxertos seminais de *J. regia* (Reil et al., 1998). Este é o porta-enxerto mais utilizado no mundo, com excepção da Califórnia. A utilização de *J. regia* tem a vantagem desta espécie ser tolerante à presença de CLRV, mas apresenta desvantagens quanto à menor tolerância ao encharcamento, ao défice hídrico e a uma maior susceptibilidade a doenças causadas por fungos no solo como *Armillaria* spp. e *Phytophthora* spp. (Pou, 2002).

Para além disso, a utilização dos porta-enxertos obtidos por via seminal, dá origem a pomares com árvores que apresentam forte heterogeneidade, no que respeita ao vigor e à produtividade (Catlin, 1998).

2.4.1.2. O grupo das noqueiras negras

O grupo das noqueiras negras pertence à secção Rhysocaryon, incluindo-se neste grupo cerca de dezasseis espécies como *J. nigra*, *J. hindsii*, *J. rupestris*, *J. major*, *J. californica*, *J. microcarpa*, entre outras, todas originárias da América (Bernard et al., 2018).

Destacam-se neste grupo na utilização de porta-enxertos, as espécies *J. nigra* e *J. hindsii*.

J. nigra é proveniente do Centro Leste dos Estados Unidos, é um porta-enxerto exigente, necessitando de solos profundos, bem drenados e isentos de calcário. Proporciona um vigor inferior às cultivares enxertadas, comparativamente a *J. regia*. É mais resistente a doenças do solo e tolerante ao frio de Invernos muito rigorosos, a sua principal desvantagem é a hipersensibilidade à doença da linha negra (Pou, 2002).

J. hindsii provem do Norte da Califórnia, começando a ser utilizada neste estado em substituição de *J. regia* no início do século XX. As vantagens estavam associadas ao crescimento mais vigoroso e maior tolerância a algumas doenças do solo e maior resistência a condições de salinidade e encharcamento. As principais desvantagens são a sensibilidade a fungos do género *Phytophthora* e a hipersensibilidade à doença da linha negra. A utilização deste porta-enxerto foi gradualmente substituída por híbridos ‘Paradox’ (Catlin, 1998; Pou, 2002; Grant & MacGranahan, 2005).

2.4.1.3. Porta-enxertos híbridos

No século XIX, cultivares francesas de *J. regia*, como a ‘Franquette’ foram introduzidas no norte da Califórnia onde já existia uma espécie autóctone, a noqueira negra da Califórnia (*J. hindsii*). Décadas depois, observou-se que alguma da descendência de *J. hindsii* ocasionalmente demonstrava alto vigor, mas pouca ou nenhuma frutificação. Foi esta descendência, resultante do cruzamento de *J. regia* com *J. hindsii*, que chamou a atenção de L. Burbank, que tinha ouvido falar de um híbrido de noqueira europeia naturalizado, tendo-o observado por volta de 1878. A maioria das espécies de *Juglans* são interférteis e Burbank iniciou os seus ensaios com cruzamentos (*J. hindsii* x *J. nigra*) e (*J. hindsii* X *J. regia*) tendo obtido híbridos que chamou respectivamente ‘Royal’ e ‘Paradox’ (Buzo et al. 2009; Pou, 2012; Preece & McGranahan, 2015). Actualmente são conhecidos com a designação de ‘Paradox’ os híbridos que possam resultar do cruzamento de uma das seis espécies de noqueiras negras (sect. *Rhysocaryon*), i.e., *J. hindsii*, *J. californica*, *J. major*, *J. nigra*, *J. microcarpa* e *J. hirsuta* com a noqueira europeia (*J. regia*). Burbank pensava que o híbrido ‘Paradox’ seria sobretudo utilizado para produção de madeira, mas na actualidade ele é utilizado sobretudo na Califórnia como porta-enxerto de cultivares de *J. regia* com o objectivo de obtenção de fruto (Suo et al., 2012).

Para a obtenção da semente híbrida eram estabelecidos campos com *J. hindsii* com algumas *J. regia* que serviam como árvores polinizadoras, as nozes resultantes deste cruzamento eram recolhidas e semeadas. Os híbridos obtidos de forma seminal eram depois seleccionados para serem transplantados posteriormente em viveiro (Reil et al., 1998).

2.4.2. Porta-enxertos clonais

2.4.2.1. Selecção e Melhoramento dos híbridos ‘Paradox’

Os híbridos ‘Paradox’ tornaram-se desde os anos 50, o grupo de porta-enxertos mais importantes para a nucicultura californiana. As cultivares de *J. regia* enxertadas em ‘Paradox’ apresentam maior vigor e resistência a algumas doenças como a bacteriose da noqueira causada por *Xanthomonas* e a armilária (*Armillaria mellea*), algumas espécies de *Phytophthora* e mais tolerantes à presença de nemátodos no solo (Grant & MacGranahan, 2005).

A UC Davis tem ao longo das últimas décadas investigado e seleccionado a partir da sua colecção de germoplasma diferentes espécies do género *Juglans*, com o objectivo de

determinar quais as soluções mais adequadas a utilizar nas combinações entre cultivares e porta-enxertos (Tulecke & McGranahan, 1994). Neste sentido, e com a utilização da micropropagação, já se conseguiram disponibilizar comercialmente, três híbridos ‘Paradox’ clonais, o ‘Vlach’, o ‘RX1’ e o ‘VX211’ (Buchner et al., 2010).

O cl. ‘Vlach’ foi obtido a partir de um híbrido ‘Paradox’ localizado na cidade Modesto na Califórnia. Foi seleccionado devido ao crescimento invulgar desta árvore, sendo a origem de algum material vegetal para a micropropagação de porta-enxertos, assim como para o programa de melhoramento de porta-enxertos de noqueira da UC Davis. Este clone encontra-se disponível comercialmente desde o início do ano 2000 nos Estados Unidos (Hasey et al., 2014) e também já se encontra disponível comercialmente no Chile e na Europa e Ásia (Portugal, Espanha, Turquia) (Peixe, comunicação pessoal).

Os clones ‘RX1’ e ‘VX211’ foram disponibilizados comercialmente em 2007, protegidos por direitos de obtentor e comercialização associados à UC Davis. O cl. ‘RX1’ é um cruzamento entre *J. microcarpa* (noqueira negra do Texas) e *J. regia*, moderadamente resistente a *Phytophthora cinnamomi* e *P. citricola*. O cl. ‘VX211’ é um cruzamento entre *J. hindsii* e *J. regia* apresenta tolerância a nemátodos e tolerância moderada a *Phytophthora* spp. (Buzo et al., 2009).

Sendo as doenças provocadas por agentes patogénicos do solo e de vírus de difícil controlo, um dos objectivos na obtenção de porta-enxertos, é aumentar a tolerância a doenças nos programas de melhoramento. Por exemplo, Kluepfel et al. (2017) verificaram através de mapeamento genético que o híbrido F1 *J. microcarpa* x *J. regia* cv. ‘Serr’, resultante do programa de melhoramento de UC Davis que apresentou resistência a *A. tumefaciens*, *P. citricola*, e *P. cinnamomi* no cromossoma 11. Além da tolerância aos fungos do solo, outro dos desafios é a obtenção de porta-enxertos tolerantes a CLRV (Leslie et al., 2017).

A enxertia da noqueira europeia (*J. regia*) em espécies do grupo das noqueiras negras (*J. nigra*, *J. hindsii*, *J. major* ou híbridos associados), apresenta um risco associado à eventual presença de CLRV no material de enxertia. Este é um problema conhecido há várias décadas nos Estados Unidos, associado à doença da linha negra que se caracteriza pelo declínio e morte da árvore vários anos após a plantação (Grant & MacGranahan, 2005; Grant et al., s/d).

2.4.3. Problemas fitossanitários associados ao uso das nogueiras negras e seus híbridos como porta-enxertos do género *Juglans*

O CLRV é o agente infeccioso associado à presença da doença da linha negra (Black Line Disease) em *Juglans*. Trata-se de um vírus, membro do subgrupo C do género *Nepovirus* da família Secoviridae (Ferretti et al., 2017).

Geralmente, nos hospedeiros infectados com CLRV surgem sintomas nas folhas como enrolamento do limbo ou cloroses associadas a círculos ou manchas. A espécie *J. regia* é susceptível ao CLRV permanecendo as plantas assintomáticas, excepto se forem enxertadas em porta-enxertos hipersensíveis (Ferretti et al., 2017; Grant et al., s/d).

Quando ocorre a infecção não surgem inicialmente sintomas evidentes nas folhas. Posteriormente a doença provoca na árvore sintomas semelhantes aos causados por doenças originadas por agentes patogénicos do género *Phytophthora*, caracterizados por um fraco crescimento terminal, clorose e queda de folhas em especial nos ramos apicais, sendo por vezes acompanhadas pela emissão vigorosa de rebentos emitidos pelo porta-enxerto. Quando a infecção progride e alcança a zona de união de enxertia, os tecidos tornam-se necróticos, sendo acompanhado pela morte destes na zona envolvente com o colapso dos feixes vasculares. Ocorre uma linha negra coincidente com a união da enxertia que rodeia o tronco, podendo provocar a morte da árvore num período de 2 a 6 anos. As árvores podem ser infectadas em qualquer idade, mas a doença é mais comum em árvores com 15 a 40 anos (Mircetich et al., 1980; Mircetich & Rowhani, 1984; Ferretti et al., 2017; Grant et al., s/d).

As espécies mais sensíveis são as pertencentes ao grupo das nogueiras negras (secção *Rhysocaryon*) como *J. nigra*, *J. major*, *J. hindsii* e os híbridos como *J. hindsii* × *J. regia*; *J. regia* × *J. major* ou *J. regia* × *J. nigra* (Ferretti et al., 2017).

O vírus transmite-se sobretudo através de pólen, podendo ocorrer através utilização de material vegetal infectado utilizado em enxertia (Mircetich et al., 1980, Mircetich & Rowhani, 1984; Ferretti et al., 2017).

A transmissão através do pólen (polinização anemófila) ocorre em *J. regia* através da infecção de árvores infectadas para árvores saudáveis. A doença manifesta os seus sintomas apenas com a enxertia de *J. regia* nas espécies sensíveis. Aparentemente, as necroses dos tecidos junto ao ponto de enxertia, devem-se a uma hipersensibilidade dos porta-enxertos ao vírus (Mircetich & Rowhani, 1984).

A primeira referência ao aparecimento da doença da linha negra no género *Juglans* ocorreu com *J. regia* cv. ‘Franquette’ enxertada em *J. hindsii* no Oregon nos EUA em 1933 (Schuster & Miller, 1933).

Delbos et al. (1983), referem que, em 1954 em França, se descreveram sintomas semelhantes, ao que, actualmente se reconhece como doença da linha negra. Os mesmos autores referem que nos anos 70 em Itália, foram isolados de nogueira, vírus associados a CLRV e que existe relação directa da presença de CLRV com a doença da linha negra em *J. regia* enxertadas em *J. nigra*.

Ozturk et al. (2008) confirmam a presença do vírus na Turquia tendo sido também referenciada na península Ibérica, na região da Catalunha por Aletà & Rovira em 2014, numa árvore de 12 anos de *J. regia* enxertada em *J. nigra*. Ferretti et al. (2017) também referem a presença do vírus e da doença associados ao declínio e morte de árvores entre os dez e os vinte anos, no Norte de Itália em cultivares californianas de *J. regia* enxertadas em híbridos ‘Paradox’.

Não sendo possível evitar a contaminação com o pólen, o problema pode ser evitado com a utilização de *J. regia* como porta-enxerto. No entanto esta opção tem pouco interesse do ponto de vista da condução do pomar (Grant & MacGranahan, 2005).

Aramburu et al. (1997) indicam que, depois de seis meses da árvore estar infectada com o vírus, este se encontra disseminado por toda a planta. Estes autores destacam a importância de se realizarem testes de despistagem, para a amostragem da presença do vírus, nas árvores mãe dadoras de material de enxertia.

2.5. Propagação em *Juglans* sp.

2.5.1. Propagação por via seminal

O processo tradicional de obtenção de plantas de nogueira, antes de os franceses desenvolverem técnicas de enxertia no século XIX, era através de semente (Pou, 2012). Na Califórnia, desde 1915 que se utilizam cultivares seleccionadas para serem enxertadas em porta-enxertos (Reil et al., 1998). Assim, o processo associado à obtenção de uma nogueira enxertada compreende as seguintes etapas: recolha e escarificação das sementes, sementeira das nozes em viveiro, emergência das plantas, crescimento, enxertia em vaso, viveiro ou local definitivo. No hemisfério Norte, as nozes são recolhidas entre Setembro e Novembro, necessitando de um processo de secagem, sendo usual a desinfecção para eliminar organismos patogénicos, utilizando soluções desinfectantes ou água quente. As nozes podem ser semeadas em viveiros no Outono, ou serem estratificadas para

sementeiras de Primavera. Alternativamente num campo de pés mães, são seleccionadas as melhores plantas germinadas junto de uma árvore mãe (por exemplo uma noqueira negra) e dois ou três anos depois são enxertadas. Com as nozes semeadas em viveiro no Outono, as necessidades de horas de frio para a quebra da dormência fisiológica da semente são garantidas no Inverno, assegurando-se assim uma estratificação natural. Caso a opção seja sementeira na Primavera, as nozes terão de ser estratificadas artificialmente em câmaras de frio (Reil et al.,1998).

Na actualidade, nos países euroasiáticos, a propagação por semente é apenas utilizada para a obtenção de porta-enxertos provenientes normalmente de *J. regia*, e na Califórnia provenientes de sementes de híbridos ‘Paradox’, e *J. hindsii* do grupo das noqueiras negras ou *J. regia* (Reil et al.,1998).

2.5.2. Propagação vegetativa

2.5.2.1. Técnicas tradicionais

2.5.2.1.1. Estacaria

A estacaria pode ser usada para propagação de porta-enxertos do género *Juglans*, mas, por norma não é aplicada, porque a viabilidade comercial desta técnica para os viveiristas é reduzida. Este género é difícil de enraizar através dos métodos tradicionais de multiplicação vegetativa, sendo que o sucesso da estacaria é muito condicionado pelo genótipo, condições ambientais e dependente da aplicação de reguladores de crescimento como auxinas (Reil et al.,1998). No entanto, apesar das dificuldades, é possível a obtenção de plantas enraizadas a partir de material semilenhoso e lenhoso.

No primeiro caso, utilizam-se ramos do ano em início de lenhificação e que tenham terminado o seu crescimento vegetativo. As estacas são preparadas com a aplicação de auxinas e colocadas a enraizar em vasos ou tabuleiros com substrato adequado, permanecendo depois em estufa com sistema de nebulização, numa temperatura entre os 24°C e os 27°C. Após 30 a 35 dias, a frequência de nebulização deve ser reduzida de modo a permitir a aclimatização das estacas enraizadas. Uma das condicionantes do processo é que o enraizamento ocorre numa fase tardia da actividade vegetativa, quando a noqueira se prepara para entrar em dormência (Reil et al.,1998).

Sutter e Mckenna (1995), utilizando híbridos ‘Paradox’ indicam taxas de enraizamento entre 40-79%.

Com a estacaria de material lenhoso, a recolha de estacas ocorre na fase de dormência. As necessidades ambientais de humidade são menos exigentes do que as necessárias às

estacas semi-lenhosas, dispensando a necessidade de equipamentos de nebulização. As estacas devem ser recolhidas logo após a queda da folha, uma vez que a utilização de material recolhido mais tardiamente, no Inverno, implica uma diminuição das taxas de enraizamento. A preparação das estacas requer a aplicação de auxinas, sendo aconselhável a utilização de alvéolos individuais e colocados em ambiente húmido durante 30 a 50 dias. As temperaturas devem enquadrar-se entre os 24°C e os 27°C. Após este período, as estacas enraizadas podem seguir para o viveiro onde prosseguem o crescimento em plena época vegetativa (Reil et al., 1998).

Sutter e Mckenna (1995), utilizando este tipo de estacaria com híbridos ‘Paradox’, apontam taxas de enraizamento entre os 10 e os 80%. Apesar de alguns bons resultados obtidos por estes autores, verificou-se ocorrer uma elevada variabilidade no sucesso do enraizamento e com taxas de sobrevivência de 27 % das plantas no campo, um ano após plantação.

2.5.2.1.2. Enxertia

As primeiras referências relativas à enxertia em nogueiras realizaram-se em França no século XIX para a multiplicação de genótipos de qualidade superior (Vadhvani et al., 2019) e na actualidade, esta é uma das técnicas mais utilizadas e disseminadas para a propagação vegetativa do género.

Consoante a metodologia, de gomo ou de garfo, a enxertia pode ser efectuada em estufas, abrigos, ou instalações agrícolas e também em viveiros ao ar livre, ou no local definitivo.

As técnicas associadas à enxertia de gomo são a enxertia de placa e gomo em T. A enxertia de placa é uma das mais antigas e mais utilizadas no campo. Consiste em retirar um fragmento rectangular de periderme do porta-enxerto, sendo substituído por um fragmento idêntico proveniente do enxerto, contendo o gomo a enxertar. A zona de enxertia é ligada e protegida com material que permita a união e a coincidência dos tecidos cambiais e de modo a garantir a humidade adequada para evitar a sua desidratação (Reil et al., 1998). Pode ser efectuada no fim da Primavera/ início do Verão, de gomo pronto, ou fim do Verão/início do Outono, de gomo dormente.

Há diferentes dados de eficiência da técnica em diversos países, sendo muito dependente da localização geográfica e respectivas condições ambientais, associadas às amplitudes térmicas entre o dia e a noite, e a eventos como geadas (Gandev, 2015). Solar

et al. (2001) indicam taxas de pegamento de apenas 16 % na Eslovénia. Em contrapartida, Ebrahimi et al. (2007) indicam cerca de 91 % de sucesso no Irão.

A outra opção é a utilização da enxertia de gomo em T, em condições de campo. Nesta técnica é efectuado um pequeno corte em 'T' num entrenó do porta-enxerto no qual é colocado um gomo da variedade de interesse. Os períodos de execução são idênticos à enxertia de placa, podendo ser realizada de borbulha ou de gomo destacado (Carlos, 2014).

Por exemplo, Ebrahimi et al. (2007) utilizando enxertia de gomo destacado obtiveram 19,1 %. Achim & Botu (2001) com a mesma técnica alcançaram resultados entre os 40 e os 78 % de pegamentos, respectivamente para porta-enxertos plantados no ano anterior e no próprio ano da enxertia.

Quanto às enxertias de garfo, elas são uma alternativa às enxertias de gomo, ainda que de um modo geral apresentem menores taxas de sucesso em condições exteriores (Gandev, 2007).

As técnicas mais utilizadas são as de cunha, fenda-inglesa e ómega. Conforme a modalidade escolhida, poderão ser executadas em condições exteriores em viveiro ou local definitivo e em condições de interior, em estufa ou em bancada (Carlos, 2014).

Barut (2001) indica taxas de 20 a 32% de pegamento com a utilização da enxertia em cunha, Achim & Botu (2001) obtiveram resultados de (50-70%) com a enxertia em fenda inglesa realizada no campo e Dehghan et al. (2010) alcançaram entre 67 a 71 % de pegamentos com a utilização de enxertia ómega.

Nas enxertias em condições exteriores, as 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 (Van Zyl, 2009).

Em condições de interior, as enxertias de garfo são realizadas no período de dormência, podendo ser utilizada qualquer uma das técnicas anteriormente referidas (cunha, fenda inglesa e a ómega). De acordo com Gandev (2015) as vantagens associadas, são a possibilidade de serem realizadas durante o repouso vegetativo, e a maior disponibilidade de tempo para esta operação, numa época do ano em que há menor oportunidade de trabalho no exterior. Nestas condições, há ainda a possibilidade de mecanizar e padronizar operações, como é o caso da enxertia ómega, podendo ser utilizadas máquinas instaladas em bancada ou ferramentas para utilizar manualmente.

A heterogeneidade dos resultados do sucesso da enxertia em nogueira está associada à variabilidade de parâmetros como a temperatura e humidade, sobretudo em condições

exteriores, sem a possibilidade de controlo das condições ambientais. Por esse motivo, nos últimos anos tem sido ensaiada a possibilidade de utilizar algumas técnicas em condições ambientais controladas, especialmente o controlo da temperatura. Existem duas formas de obter este controlo, com o aquecimento da planta completa em salas climatizadas (estratificação) ou com o aquecimento apenas da zona do ponto de enxertia (Van Zyl, 2009; Gandev, 2015).

No primeiro processo, as temperaturas são homogéneas e elevadas nas salas de estratificação, esta condição promove o abrolhamento tanto do enxerto como do porta-enxerto, levando ao consumo de reservas que deveriam ser utilizadas para a formação do *callus* de enxertia, o que representa uma desvantagem deste processo (Van Zyl, 2009). No segundo processo são utilizadas tubagens aquecidas. Após a enxertia, normalmente de garfo, a tubagem é colocada junto do ponto de enxertia de modo a garantir uma temperatura constante de 26-27°C, na área em redor do enxerto, mas mantendo os gomos e o sistema radicular expostos às condições da envolvente ambiental, não sujeitos a aquecimento (Van Zyl, 2009). O mesmo autor refere a enorme variabilidade dos resultados obtidos na Europa, com as técnicas tradicionais de enxertia de gomo e garfo, muito dependentes das condições ambientais exteriores e compara-os com os resultados promissores da técnica das tubagens aquecidas, indicando este método como alternativa às técnicas mais tradicionais.

Com o controlo das condições ambientais, existe ainda a possibilidade de efectuar as enxertias de hipocótilo e epicótilo em porta-enxertos de origem seminal.

No caso da enxertia de hipocótilo, a enxertia é efectuada abaixo do ponto de inserção dos cotilédones, podendo ser realizadas enxertias de garfo durante o período vegetativo com a técnica de fenda de incrustação de topo (Gandev, 2015). Gandev & Dzhuvinov (2006) utilizaram plantas envasadas e envoltas em sacos de polietileno de modo a manter níveis elevados de humidade relativa, tendo obtido 83 % de taxa de pegamentos, também Vahdati & Zareie (2006) obtiveram resultados aceitáveis com cerca de 70 % de sucesso.

Relativamente à enxertia de epicótilo, a enxertia é efectuada acima do ponto de inserção dos cotilédones. Gandev & Arnaudov (2011) com este método utilizaram enxertos no período de dormência, tendo colocado as plantas enxertadas em salas com temperatura controladas de 25-27°C, e com as raízes tapadas com substrato em caixas envoltas em filme plástico para a manutenção de uma elevada humidade relativa. Após o abrolhamento e a formação do *callus* de enxertia, as plantas foram envasadas. Estes autores obtiveram 42 a 75 % de sucesso. Estes resultados dependeram da cultivar e da

data de enxertia. Com o mesmo processo, Suk-In et al. (2006) obtiveram valores entre os 65 a 85 % de pegamentos bem-sucedidos.

Independentemente da técnica utilizada, as condições ambientais (temperatura e humidade) condicionam significativamente o sucesso das mesmas. A temperatura é um dos principais factores que influencia a formação de *callus* (Van Zyl, 2009). Com 22 °C a formação de *callus* começa 6 dias após a enxertia, enquanto com 27°C, inicia-se ao 7º dia, com o aumento para 32° C, a formação inicia-se ao 4º dia, mas com menos tecido caloso produzido (Rongting & Pinghai, 1993).

Assim sendo, a temperatura padrão adoptada por diversos investigadores nos seus ensaios em condições ambientais controladas tem sido 27°C (\pm 2°C) (Van Zyl, 2009; Gandev, 2015), sendo importante manter a temperatura constante após a enxertia, para uma formação adequada do *callus* de cicatrização (Hartmann et al., 2014).

O controlo de temperatura pode ser efectuado no ponto de enxertia, como referido no método do aquecimento localizado na zona do *callus* ou criando condições integrais de temperatura controlada à planta enxertada (Van Zyl, 2009).

O conhecimento da importância da temperatura, neste processo, permite definir para cada região, as melhores épocas de realização da enxertia nos casos onde as condições climáticas não podem ser controladas, como é o caso das enxertias de campo em viveiro ou em local definitivo, havendo casos em que a Primavera é a melhor altura e outros em que as condições são mais indicadas no Verão ou no Outono.

No que à humidade diz respeito, a manutenção deste parâmetro em níveis elevados no período após a enxertia, é fundamental para evitar a desidratação do ponto de enxertia.

Rongting & Pinghai (1993) nos seus ensaios verificaram que, quando os níveis de humidade no ponto de enxertia atingiam um nível crítico mínimo de 38% de humidade, não ocorria a formação de *callus*.

Farsi et al. (2016) indicam que a humidade relativa deve ser mantida a 80-90% imediatamente a seguir à operação de enxertia, uma vez que a células do *callus* estão sujeitas a desidratação em ambiente seco.

A escolha adequada dos materiais de união e protecção do enxerto que garantam os níveis adequados de humidade é um aspecto determinante no sucesso das diferentes técnicas quer em condições de campo quer em espaços interiores (Sadeghi et al., 2018).

2.5.2.2. Propagação *in vitro*

2.5.2.2.1. Microestacaria

A primeira referência à utilização da micropropagação no género *Juglans* deve-se a Chalupa (1981) (Leslie & McGranahan, 1992). Desde então, diversos trabalhos foram desenvolvidos para melhorar os processos de micropropagação nestas espécies e seus híbridos (Driver & Kuniyuki, 1984; McGranahan et al., 1988, Jay-Allemand et al., 1992; Leslie & McGranahan, 1992; Lopez, 1999; Leal et al., 2007; Vahdati et al., 2009; Moreno et al., 2012; Peixe et al., 2015).

O protocolo de micropropagação com o objectivo de obtenção de plantas enraizadas abrange as seguintes fases; - estabelecimento da cultura em assepsia, - multiplicação, - alongamento, - enraizamento e aclimatização (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011).

2.5.2.2.1.1. Estabelecimento da cultura em assepsia

O estabelecimento *in vitro* pode ser iniciado a partir de material proveniente de embriões zigóticos, ou originário de material vegetal de plantas mãe, numa fase juvenil ou adulta. O processo é mais simples utilizando material proveniente de tecidos mais herbáceos em estado juvenil durante o crescimento vegetativo (Leslie & McGranahan, 1992).

A iniciação da cultura em assepsia implica que todo o material vegetal deve ser sujeito a processos de desinfecção. No caso da multiplicação por rebentação axilar, o material a desinfetar consiste em fragmentos de caules contendo gomos axilares ou terminais retirados de uma planta mãe seleccionada (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011).

O sucesso do estabelecimento e a manutenção em condições assépticas de cada espécie e tipo de explante requer ensaios, com diferentes combinações de desinfectantes, com várias concentrações e diferentes tempos de contacto. Os melhores resultados são aqueles que apresentem um bom compromisso entre a desinfecção e a sobrevivência dos explantes. A desinfecção actua apenas na superfície dos tecidos vegetais, não eliminando infecções no seu interior e na sua realização podem ser utilizadas diferentes produtos como hipoclorito de cálcio, bicloreto de mercúrio, mercurbutol, adicionados ou não de detergentes tensioactivos como o Tween (Carlos, 2014).

O processo de desinfecção para *Juglans* inicia-se geralmente com uma passagem dos explantes em água corrente durante 4-6 horas para lavagem dos exsudados fenólicos. Seguidamente utiliza-se etanol a 50-70% por 20 a 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio com 3-5% de cloro activo adicionado de Tween 20 a 0,01% por 10-20 minutos.

Finalmente, realizam-se várias lavagens com água estéril para eliminar os resíduos dos desinfetantes (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011; Carlos, 2014).

Após a desinfecção, o material vegetal é segmentado e colocado em meio de iniciação, com repicagens frequentes, num período de várias semanas ou meses, rejeitando os explantes contaminados, até à obtenção de segmentos viáveis que possam seguir para a fase seguinte (McGranaham et al., 1988).

Apesar de ser utilizada para a eliminação de bactérias e fungos na superfície de tecidos vegetais, a desinfecção não é eficiente para a eliminação de vírus presentes no seu interior. Para iniciar um processo de selecção de material de isento de vírus, é necessária a utilização de técnicas como a culturas de meristemas ou a termoterapia, que por si, só não garantem a obtenção de material isento de vírus. Em combinação com estas técnicas, é necessária a utilização de testes de despistagem. A regeneração de plantas isentas de vírus, não implica imunidade a uma posterior infecção viral (Canhoto, 2010).

2.5.2.2.1.2. Multiplicação

Os explantes, que durante a fase de instalação evoluíram favoravelmente, são fragmentados em segmentos com um ou dois gomos, e colocados em meio de multiplicação, onde, em condições adequadas, irão evoluir e originar os novos explantes (Leslie & McGranaham, 1992).

Os principais factores que influenciam o processo são, a formulação mineral do meio de cultura, os tipos e níveis dos reguladores de crescimento, a fonte de carbono, o agente gelificante, as condições ambientais, o genótipo e a posição do gomo no explante.

Relativamente à formulação mineral do meio de cultura, têm sido testadas para a noqueira diversas formulações, sendo o DKW (Driver & Kuniyuki, 1984), o WPM (Lloyd & McCown, 1981) e o MS (Murashige & Skoog, 1962) os mais utilizados. A formulação do meio DKW foi desenvolvida para os híbridos 'Paradox' (Driver & Kuniyuki, 1984), mas também tem apresentado bons resultados na maioria das Juglandáceas, sendo na actualidade, a mais usual na cultura *in vitro* do género *Juglans* (Leslie & McGranaham, 1992; Saadat & Hennerty, 2002; Vahdati et al., 2019).

No que respeita aos reguladores de crescimento, os principais são as auxinas, e as citocininas, que intervêm em diferentes processos fisiológicos como a formação de *callus*, o alongamento dos explantes ou abrolhamento dos gomos. As auxinas intervêm na divisão, alongamento, diferenciação celular e dominância apical, enquanto as citocininas

intervém na divisão celular, quebra da dominância apical, estímulo da rebentação axilar e multiplicação celular (Davies, 2013).

Desde os anos 80, que têm sido utilizadas auxinas como o AIB, o AIA, o ANA e o 2,4-D e citocininas como o BAP, a Ki ou o TDZ, sendo a combinação AIB/BAP a mais utilizada (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011).

Saadat & Hennerty (2002) referem que a combinação de 0,01 mg L⁻¹ AIB e 1 mg L⁻¹ BAP se tem revelado a mais adequada, sendo indicado também que concentrações mais baixas de BAP não se adequam devido à baixa qualidade morfológica dos explantes.

No que diz respeito às fontes de carbono utilizadas na formulação do meio, a mais referenciada para a composição dos meios DKW e MS é a sacarose, com concentração de 3% (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011).

Existe ainda a possibilidade da utilização da frutose em substituição da sacarose (Leslie et al., 2006).

No que respeita aos agentes gelificantes, poderão ser utilizadas formulações comerciais de agar, Phytigel®, ou Gelrite (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011). Existem algumas diferenças na composição mineral dos gelificantes. Por exemplo, a Gelrite contem uma maior quantidade de Ca, Mg, K e Fe comparativamente a uma formulação de agar como o Difco Bacto, que contem mais Na. No caso das formulações de agar com maiores teores de Na, poderão ocorrer inconvenientes com a acumulação de Na nos tecidos vegetais, acelerando o envelhecimento da cultura da noqueira estabelecida *in vitro* (Barbas et al., 1993).

Leslie & McGranahan (1992) referem que alguns utilizadores do meio DKW evitam a utilização de Gelrite, devido a problemas de vitrificação, no entanto, estes autores referem que, tal pode ser evitado com a utilização de recipientes de cultura que permitam um maior fluxo de trocas gasosas.

Relativamente às condições ambientais, as que influenciam os processos de multiplicação *in vitro* são a luz e a temperatura.

Payghamzadeh & Kazemitabar (2011) referem que, os melhores resultados são obtidos com um fotoperíodo de 16 a 18 horas e uma intensidade luminosa entre os 40 e os 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, normalmente garantidos por lâmpadas fluorescentes.

No que diz respeito à temperatura, Payghamzadeh & Kazemitabar (2011), indicam que nesta fase há referências entre os 25 e os 28 °C. No caso do híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’, Carlos (2014) utilizou temperaturas entre os 24-22 °C, dia e noite, respectivamente.

Para a propagação comercial da nogueira, a taxa de multiplicação deve garantir um compromisso entre o material disponível para manutenção dos explantes em multiplicação e o material destinado ao enraizamento. O genótipo e a posição dos gomos ao longo dos explantes desenvolvidos *in vitro* apresentam-se como factores importantes que influenciam esta taxa.

Relativamente ao genótipo, Cornu & Jay-Allemand (1989), para clones de híbridos *J.nigra* x *J. regia*, obtiveram diferenças nas taxas de multiplicação e número de gomos ao longo de seis semanas, tendo os melhores clones obtido uma taxa de multiplicação de 1,5.

No que diz respeito à posição do gomo ao longo do explante, Campos et al. (2017) verificaram que a taxa de multiplicação do híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’ foi influenciada significativamente por este factor. Novos explantes, provenientes sucessivamente de gomos entre o ápice e o 3º entrenó, quando submetidos a sucessivas subculturas a cada 30 dias, foram perdendo gradualmente a capacidade de multiplicação, tornando-se esta praticamente quase nula após cinco subculturas. Pelo contrário, os novos explantes provenientes dos gomos abaixo do 3º entrenó, alcançaram uma taxa de multiplicação de 5,5, não se tendo observado diferenças significativas entre a 1ª e a 5ª subculturas.

2.5.2.2.1.3. Alongamento

A fase de alongamento não é necessária em todas as espécies. Tal como acontece com outras fruteiras, a nogueira é uma espécie que apresenta uma forte dominância apical, não sendo necessário um meio de cultura diferenciado para estimular o alongamento. No entanto, importa referenciar alguns dos factores que durante a fase de multiplicação podem condicionar o alongamento dos explantes. De entre estes, destacam-se a formulação mineral do meio de cultura e a concentração de reguladores de crescimento.

No que respeita à formulação do meio de cultura, Driver & Kuniyuki (1984) verificaram que, efectuando subculturas no híbrido ‘Paradox’, em meio WPM, a cultura tinha tendência para formar *callus* em detrimento do crescimento dos explantes, mantendo-se estes com crescimento reduzido.

Heile-Sudholt et al. (1986) observaram o mesmo comportamento em *J. nigra* na comparação dos meios DKW e WPM, tendo verificado maior alongamento, expansão foliar e melhor aspecto qualitativo dos explantes em meio DKW.

Saadat & Hennerty (2002) comparando os meios DKW, MS e WPM comprovaram a viabilidade da utilização dos meios DKW e MS em cultivares de *J. regia*, no entanto, com

o meio MS a distância entre gomos foi menor e conseqüentemente com entrenós mais curtos e no caso do meio WPW não ocorreu alongamento dos explantes, mas apenas formação excessiva de *callus*.

No que respeita à influência associada aos reguladores de crescimento, Chalupa (1981) cit. por Payghamzadeh & Kazemitabar (2011) refere o sucesso no alongamento de gomos axilares, originários de segmentos nodais em *J. regia* de origem seminal, em meio MS contendo 0.4 μM (0,09 mg L^{-1}) de BAP e 0.8 μM (1,48 mg L^{-1}) de ANA.

Scaltsoyiannes et al. (1998) analisaram a produção de gomos axilares e alongamento dos explantes em *J. regia*. Testando diferentes concentrações e combinações de BAP e AIB, foi verificado que a combinação 4,44 μM BA (1 mg L^{-1}) e 0,005 μM AIB (0,001 mg L^{-1}) foi a que melhor conjugou o alongamento, com explantes com altura média de 3 cm, com uma média de 3 novos gomos axilares. Uma das tendências observadas foi que à medida que aumentou a concentração em BAP, aumentou também o número de gomos axilares, verificando-se uma tendência de diminuição do comprimento dos explantes.

Saadat, & Hennerty (2002) testaram a concentração de BAP adequada para o alongamento de *J. regia* tendo sido analisadas concentrações que variaram entre os 0,2 e 1 mg l^{-1} . A concentração de 0,2 mg l^{-1} apresentou diferenças estatisticamente significativas, com explantes muito finos com entrenós longos. À medida que a concentração aumentava, o comprimento dos explantes diminuiu, mas o número de lançamentos/rebentos axilares, peso fresco do *callus* e número de folhas aumentou. Observou-se uma tendência do alongamento do lançamento principal à medida que diminuía a concentração de BAP, tendência que se verificou também nos dados registrados por Scaltsoyiannes et al. (1998).

Parece pois que, a multiplicação e o alongamento dos explantes, condições necessárias para um bom compromisso entre a reposição do material em cultura e a disponibilidade de bons explantes para a fase de enraizamento, estão dependentes de uma boa relação auxina/citocinina e que esta deve ser estudada caso a caso, uma vez que o genótipo influencia determinantemente o comportamento da noqueira.

2.5.2.2.1.4. Enraizamento

Caso se consiga uma adequada taxa de multiplicação, que permita a manutenção de ciclos regulares de multiplicação com explantes com características adequadas, segue-se a fase do enraizamento.

Nesta fase, decorrem os processos fisiológicos associados ao enraizamento adventício, estando estes organizados numa sequência de três fases, a indução, associada a eventos moleculares e bioquímicos, a iniciação, compreendendo os primeiros eventos histológicos, e a expressão, com a emergência dos primeiros primórdios radiculares. A duração das fases é variável consoante a espécie, sendo que a compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares que influenciam estes processos ainda permanecem relativamente desconhecidos (Porfírio et al., 2016).

Alguns dos factores que influenciam os processos de enraizamento são, a formulação do meio de cultura, a fonte de carbono, os reguladores de crescimento, a luz, o tipo de explantes colocados em indução, o genótipo, substrato e as condições ambientais.

Relativamente à formulação dos meios de cultura, é usual a utilização de meios com uma concentração iónica mais baixa do que os usados na fase de multiplicação, ou a utilização do mesmo meio com uma redução da concentração em macronutrientes. (Carlos, 2014). Payghamzadeh & Kazemitabar (2011), por exemplo, referem a necessidade de redução de macronutrientes como o azoto ou cálcio, apontando os exemplos da utilização de ½ do meio MS ou ¼ do meio DKW.

No que diz respeito às fontes de carbono, a mais indicada é a sacarose, sendo que a concentração mais referenciada é de três por cento, uma vez que concentrações superiores podem provocar necrose dos ápices (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011). Os resultados obtidos por Peixe (comunicação pessoal cit. por Carlos 2014), que testou no enraizamento do híbrido 'Paradox' cl. 'Vlach' e de *J. regia* cv. 'Chandler', em meio de indução DKW, concentrações de sacarose de 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹, também foram nesse sentido, tendo obtido os melhores resultados com a concentração de 30 g L⁻¹.

Relativamente à utilização de reguladores de crescimento com o objectivo de promover o enraizamento, apenas se utilizam auxinas, não sendo utilizadas citocininas, uma vez que a sua presença inibe a formação de raízes (Carlos, 2014).

As auxinas são utilizadas nos meios associados à subfase de indução, sendo dispensáveis na subfase de expressão radical que utilizam métodos de enraizamento *in vitro*, isto porque de um modo geral, o seu contacto prolongado com o explante, condiciona o desenvolvimento posterior das raízes em especial nas espécies difíceis de enraizar, como é o caso de espécies e híbridos do género *Juglans* (Caboni & Damiano, 2006; Carlos, 2014).

A auxina mais utilizada na indução do enraizamento é o AIB, embora existam referências da utilização de ANA (Driver & Kuniyuki, 1984; Leslie & McGranahan,

1992). De acordo com diferentes autores (Scaltsoyiannes et al., 1997; Vahdati et al., 2009; Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011; Carlos, 2014), a concentração mais adequada é variável conforme o genótipo e as condições de indução do enraizamento, existindo referências na utilização de AIB que podem variar entre os 3 e os 15 mg L⁻¹.

Relativamente à presença ou ausência de luz, na formação de raízes adventícias, os aspectos que determinam a capacidade de enraizamento, são a intensidade da luz e o seu tempo de exposição. A sua influência na capacidade de enraizamento é variável em diferentes espécies, sendo que a presença de luz aparenta ter um efeito inibidor no enraizamento (Porfírio et al., 2016), devido a efeitos de foto oxidação associados à degradação das auxinas, no entanto, os mecanismos fisiológicos associados, ainda não são bem claros (Taiz & Zeiger, 2010).

Para a indução de raízes no género *Juglans* é utilizado usualmente um período de alguns dias no escuro (Driver & Kuniyuki, 1984; Gruselle et al., 1987; Cornu & Jay-Allemand, 1989; Carlos, 2014).

Diversos trabalhos têm analisado o período temporal do efeito do escuro nas taxas de enraizamento em noqueira durante a subfase de indução. Gruselle et al. (1987) não obtiveram enraizamento com quatro ou menos dias de escuro, obtendo enraizamento apenas com oito e doze dias respectivamente 11 e 33 %. No mesmo sentido, Pei et al. (2007) indicam taxas de enraizamento de 75 % no escuro e de 0% com a presença da luz. Também Carlos (2014) obteve para a cv. ‘Chandler’, com nove dias de escuro e para o cl. ‘Vlach’ com sete dias de escuro, taxas de enraizamento de respectivamente 85 e 78 %.

No que se refere à selecção do tipo de explantes colocados em enraizamento, este factor depende de alguns critérios de selecção de qualidade em função do aspecto visual. McGranahan et al., (1987) para o híbrido ‘Paradox’ seleccionando explantes vigorosos com 3 a 10 cm obtiveram mais de 90 % de enraizamento. No entanto, Vahdati et al. (2004) indicam que explantes de menor dimensão também poderão ser enraizados.

Campos et al. (2017) analisaram as taxas de enraizamento do cl. ‘Vlach’ comparando explantes de origem basal e apical. Os primeiros apresentaram uma taxa de enraizamento de 43 % e os segundos cerca de 75%.

No caso do genótipo, a sua influência é determinante na capacidade de enraizamento dos explantes. Diferentes ensaios no género *Juglans* assim o têm demonstrado. Leslie et al. (2006) comparando dezoito genótipos de híbridos ‘Paradox’, observaram uma elevada variabilidade na capacidade de enraizamento, compreendida entre os 100 e os 0 % entre os diferentes genótipos. Vahdati et al. (2009) compararam as respostas de material

estabelecido *in vitro* originário de plantas-mãe de genótipos de *J. regia* com alto e baixo vigor. Foi verificado que as melhores taxas de enraizamento, assim como o maior número médio de raízes se conseguiam nos genótipos de baixo vigor.

Relativamente aos substratos, as primeiras propostas de formulações para esta fase consistiam na utilização de um substrato composto por um meio DKW gelificado com Gelrite e vermiculite nas proporções 250/200 (v/v) (Jay-Allemand et al., 1992). Ripetti et al. (1994) referem um enraizamento de quase 100% em meio de expressão radical DKW ($\frac{1}{4}$ macronutrientes) gelificado com gelrite e adicionado de vermiculite, na proporção 160/200 (w/v) sem auxinas e na presença de luz.

O sucesso da utilização da vermiculite misturada no meio gelificado, deve-se a um efeito que garante um bom arejamento e humidade, criando condições adequadas para uma boa formação de raízes. Este é um aspecto fundamental para garantir a transição adequada da parte aérea das plantas, das condições *in vitro* para *ex vitro*.

Em todos os processos de enraizamento *in vitro*, o mesmo é feito em condições de assepsia e as plantas produzidas são transferidas de raiz nua para aclimatização, situação que compromete o sucesso dessa fase, pois, como será referido no ponto relativo à aclimatização, o género *Juglans* é particularmente sensível à transferência das condições *in vitro* para *ex vitro*. Tendo em conta este aspecto, Carlos (2014) testou a utilização de substratos que permitissem o transplante dos explantes com raiz protegida num processo de enraizamento *ex vitro* após a indução radical. Os substratos utilizados foram Jiffy Preformas®, pastilhas de turfa prensada, cubos de lã de rocha, e comparados com o procedimento mais comum estabelecido por Jay-Allemand et al. (1992), utilizando a vermiculite e meio DKW gelificado, e em que o transplante é feito de raiz nua. Os melhores resultados foram obtidos com substrato orgânico comercial com 78% de enraizamento médio, significativamente superior ao método tradicional com vermiculite com um enraizamento de 30%.

Peixe et al. (2015) indicam que um dos factores de sucesso para taxas de enraizamento e consequente aclimatização, é a utilização de substratos que protejam a raiz e garantam níveis de humidade adequados.

2.5.2.2.1.4. Aclimatização

A aclimatização é uma das fases mais sensíveis do processo de cultura *in vitro* para a obtenção de nogueiras. É nesta fase que ocorre a perda de um elevado número de plantas,

aspecto que pode ter condicionado o interesse dos laboratórios comerciais de propagação na multiplicação do género *Juglans* (Peixe et al.,2015).

Há vários factores que influenciam as condições de cultura da noqueira nesta fase, como as características ambientais dentro dos recipientes onde se encontrava o material vegetal *in vitro* e as características morfológicas do género *Juglans*.

Relativamente ao factor ambiental da cultura *in vitro*, este é caracterizado por uma atmosfera saturada, com fluxos fotónicos fotossintéticos inferiores a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e reduzidas trocas gasosas. Estas características implicam condições especiais para os explantes colocados em recipientes relativamente estanques ao ar, sendo que estas condições ambientais resultam na formação de explantes com morfologia, anatomia e fisiologia anormais (Pospóšilová et al.,1999).

Do ponto de vista fisiológico, verifica-se que as elevadas taxas de transpiração das plantas cultivadas *in vitro* estão associadas ao funcionamento irregular do aparelho fotossintético e desenvolvimento insuficiente da cutícula, cera cuticular e estomas funcionais (Pospóšilová et al.,1999).

Com as características ambientais de humidade relativa elevada dentro dos recipientes de cultura *in vitro* a condicionar o comportamento fisiológico das plantas, a fase de aclimação apresenta-se como crítica. Assim, deve-se garantir uma transição gradual, sem mudanças demasiado bruscas da fase *in vitro* para *ex vitro*, com o objectivo de evitar desordens fisiológicas associadas à desidratação dos explantes, que podem significar perdas consideráveis (Bandeira et al., 2007).

Após a transição das condições *in vitro*, na fase de aclimatização ocorrem alterações morfológicas como o espessamento da folha, alteração do número de cloroplastos e diferenciação do mesófilo. Ocorrendo uma transição gradual, as anormalidades fisiológicas podem ser reparadas nas condições *ex vitro*. O desenvolvimento da cutícula e da regulação estomática na transpiração estimulam assim a estabilização do estado hídrico da planta e seu normal funcionamento fisiológico (Pospóšilová et al.,1999).

No que respeita às características morfológicas do género *Juglans*, os cuidados a adoptar na aclimatização são ainda mais importantes devido a aspectos anatómicos das folhas deste género, implicando uma elevada susceptibilidade à sua desidratação (Vahdati et al., 2019).

A epiderme apresenta metade da espessura comparativamente a plantas de estufa, apresentando maior densidade de estomas por unidade de área de folha, maior abertura estomática com taxas de transpiração mais elevadas (Vahdati & Aliniaiefard, 2017).

Deste modo, nos primeiros trabalhos de aclimatização de nogueiras originárias de cultura *in vitro*, e considerando a sensibilidade do processo, Driver & Suttle (1987) patentearam um método de enraizamento directo de explantes tratados previamente com auxinas. As plantas eram plantadas em viveiros cobertos com estufins e cobertas com recipientes plásticos transparentes para a manutenção de humidades relativas elevadas e reduzir a intensidade de luz. O método foi testado experimentalmente com sucesso, mas não era eficiente para ser utilizado na produção comercial (Vahdati et al., 2004). Depois, o método de aclimatização utilizado por Jay-Allemand (1992) foi uma mistura de sistemas de nebulização ultra-sónica com iluminação artificial.

Mais recentemente, Peixe et al. (2015) obtiveram 75% na aclimatização de híbridos ‘Paradox’, cujo sucesso se deveu em parte à utilização de um substrato protegendo as raízes com condições de humidade adequadas.

2.5.2.2.2. Microenxertia

A definição de microenxertia é ampla e pode englobar técnicas em condições *in vitro* e em condições *ex vitro*. Na primeira situação, é utilizado tanto para o enxerto como para o porta-enxerto, material vegetal em condições de assepsia e baseia-se no princípio de enxertar um meristema ou gomo num porta-enxerto de origem seminal ou clonal. No segundo caso, a enxertia é realizada em condições não assépticas em viveiro, estufa ou condições de interior e consiste na utilização de material vegetal de pequenas dimensões com o objectivo, por exemplo, de obter plantas destinadas ao transporte de longa distância (Hartmann et al., 2014).

Os trabalhos de Murashige et al. (1972), Navarro et al. (1975) e Navarro & Juarez (1977) foram pioneiros na nova técnica de microenxertia *in vitro* com a finalidade de efectuar a limpeza sanitária de vírus no género *Citrus*, tendo sido adaptada, entretanto, a outras lenhosas (Navarro, 1988). Por exemplo, em Espanha, a utilização da microenxertia permitiu obter dezasseis milhões de plantas limpas de vírus e instaladas em local definitivo, possibilitando a melhoria qualitativa da indústria de transformação de citrinos espanhola (Navarro & Juarez, 1977; Navarro, 1988).

Deogratias et al. (1986) utilizaram a técnica para obter prunoideas (cerejeiras e pessegueiros) limpas de vírus. Foram alcançados resultados de 50 % de pegamentos das enxertias dos ápices meristemáticos, provenientes de plantas na sua fase juvenil, comparativamente aos 15 % (pessegueiro) e 20 % (cerejeira) de sucesso obtido com material originário de plantas adultas. É referido que o tamanho do enxerto influenciou o

sucesso do pegamento e que enxertos com dimensões inferiores a 0,4 mm foram inviáveis. Obteve-se 65% de sucesso em material de maiores dimensões, no entanto a probabilidade de obter plantas livres de vírus aumentou à medida que diminuiu o tamanho do enxerto.

Outros objectivos da técnica estão associados a estudos de compatibilidade entre enxertos e porta-enxertos, estudos histológicos e fisiológicos ou à produção de plantas difíceis de obter com técnicas clássicas (Hussain et al., 2014).

Martínez-Gómez & Gradziel (2001) indicam a utilidade da técnica para o programa de melhoramento da amendoeira, uma vez que permitiram ensaiar precocemente a compatibilidade entre as diferentes cultivares e porta-enxertos. Estes autores testaram a enxertia de gomos não abrolhados e abrolhados da cv. 'Nonpareil' em porta-enxertos de pessegueiro das cvs. 'Nemaguard' e 'Nemared' e no híbrido de pessegueiro e amendoeira cv. 'Hansen'. Verificaram que a utilização de gomos já abrolhados (69%) teve melhores resultados relativamente aos não abrolhados (54%). Com o objectivo de investigar os processos moleculares associados aos eventos fisiológicos após a enxertia, Liu et al. (2017) utilizaram a microenxertia em híbridos 'Paradox' transformados geneticamente. Foi avaliada a estabilidade de um gene repórter no porta-enxerto transformado e verificar se ocorria translocação de ADN transformado para o enxerto não transformado. Verificou-se que não ocorreu translocação de ADN, mas sim do transcrito do mRNA modificado, do porta-enxerto para o enxerto.

Na propagação de material vegetal seleccionado, Millán et al. (2004) utilizaram clones de pinheiro manso. Como porta-enxertos foram utilizados hipocótilos de duas semanas germinados de semente em condições *in vitro*. O protocolo teve um sucesso geral de 43%. Estes autores apontam a grande variabilidade de resultados associadas às técnicas de microenxertia e que o material na fase juvenil é mais adequado que material mais velho ou por enraizar.

Para a propagação de eucaliptos, Bandeira et al. (2007), utilizaram porta-enxertos oriundos de plântulas de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* germinadas *in vitro* e como enxertos, ápices caulinares de dois clones de *E. urophylla* x *E. grandis* micropropagados. Após 50 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram transferidas para condições *ex vitro*, verificando-se uma taxa 87 % de sobrevivência dos enxertos aos 70 dias, com bom vigor no crescimento em altura.

Yıldırım et al., (2013) com o objectivo de aumentar a eficiência da propagação da amendoeira, ensaiaram a microenxertia em condições *in vitro* em três cultivares, a

‘Texas’, a ‘Ferrastar’ e a ‘Nonpareil’. A taxa de sucesso variou entre 83 a 100% em função da cultivar.

Em condições de transição entre *in vitro* e *ex vitro*, Leslie & McGranahan (1992) referem a utilização de enxertos de *J.regia* provenientes de cultura *in vitro* para a enxertia em porta-enxertos seminais. Foi realizada enxertia de fenda, com utilização de parafilme para a união do ponto de enxertia, sendo as plantas tratadas com fungicida e mantidas em estufa em ambiente com elevada humidade relativa durante algumas semanas, para uma aclimatização gradual. No entanto, estes autores não indicam dados relativos ao sucesso do processo.

No caso de propagação de plantas ornamentais com elevado valor de mercado e com objectivos de optimização de processos produtivos, Pahnekolayi et al. (2019) ensaiaram material de roseiras originário *in vitro* onde testaram diferentes meios de cultura e materiais de união da ligação. Os resultados indicaram boas perspectivas para a optimização de um protocolo para obtenção de roseiras microenxertadas com elevada qualidade sanitária.

2.6. Influência da presença de gomos e folhas no processo de formação de raízes adventícias e na formação das ligações vasculares na enxertia

Os meristemas apicais e as folhas jovens são locais primários para a síntese das auxinas, sendo que os processos de formação de raízes adventícias e de desenvolvimento de novos tecidos vasculares estão associados a processos fisiológicos onde há a participação das auxinas (Taiz & Zeiger, 2010). Estas são translocadas por efeitos do transporte polar, do ápice para os pontos de enxertia e base das estacas, nos locais onde decorrem respectivamente os processos de pegamento da enxertia e de enraizamento adventício (Hartmann et al., 2014).

Relativamente ao enraizamento, depois da descoberta e importância das auxinas neste processo, foi verificado que em determinadas espécies, estacas sem gomos não formam raízes, mesmo quando tratadas com auxinas exógenas, apesar de este comportamento não ser generalizável a todas as espécies. Assim, existem outras substâncias, além das auxinas que são sintetizadas nos gomos, folhas ou caules que intervêm nos processos de rizogénese. Uma das hipóteses sugeridas era a participação de cofactores como a rizocalina (Hartmann et al., 2014), mas os fundamentos que sustentavam esta hipótese têm vindo a ser ultrapassados.

Porfirio et al. (2016) indicam que, os reguladores de crescimento como as auxinas conjugam-se com substâncias como aminoácidos, péptidos e proteínas, participam nos processos fisiológicos associados ao enraizamento adventício, assim como as poliaminas e enzimas oxidativas.

Nos processos de propagação por estacaria, o tipo de preparação do material vegetal considerando, por exemplo a presença ou ausência de folhas, depende da espécie.

Güneş (1999) ensaiou o enraizamento de estacas lenhificadas de *J.regia* sem folhas no período de dormência. Foram utilizadas auxinas, e sem a presença de folhas, não se formaram raízes, verificando-se a formação de *callus* apenas na presença de gomos vegetativos. Neste trabalho, verificou-se que a presença de folhas é determinante para a formação de raízes adventícias em noqueiras.

A remoção dos gomos das estacas em determinadas espécies implica a paragem do processo de formação de raízes como verificado, por exemplo, na propagação por estacaria de pereira cv. 'Old Home', onde não se formaram raízes mesmo com a aplicação de auxinas exógenas (Hartmann et al., 2014).

No que respeita à formação de ligações vasculares, a capacidade que as plantas têm em recuperar estas ligações, permite que a enxertia seja uma técnica de propagação de plantas, na combinação de enxertos e porta-enxertos com determinadas características de interesse. Após a ruptura e, ou, a quebra integral dos tecidos vasculares, o restabelecimento dos feixes vasculares irá ocorrer através do *callus* formado por uma massa de células totipotentes do parênquima, que permite unir enxerto e porta-enxerto (Hartmann et al., 2014).

Os primeiros tecidos vasculares produzidos no *callus* são xilema de reparação e floema. Estes novos tecidos são provenientes sobretudo da actividade do enxerto. A quantidade inicial de xilema de reparação é sobretudo influenciada pela presença de folhas e caules no enxerto e não pelo porta-enxerto (Hartmann et al., 2014).

Apesar do conhecimento já existente sobre a fisiologia associada à formação das ligações vasculares, ainda existe alguma especulação relativamente ao papel desempenhado por auxinas e outros reguladores de crescimento no processo de enxertia, não sendo ainda totalmente clara, a compreensão dos mecanismos fisiológicos em participam os reguladores de crescimento, na reconstituição dos tecidos após lesões (Wulf et al., 2019).

Melnyk & Meyerowitz (2015) sugerem que, após o corte associado à enxertia, a acumulação de citocininas no porta-enxerto e de auxinas no enxerto pode desencadear a

expressão de genes associados às respostas de cicatrização e formação de feixes vasculares.

Sharma & Zheng (2019) referem o papel desempenhado por auxinas e citocininas em alguns dos processos fisiológicos associados à enxertia. Assim, as funções principais associadas às auxinas estão relacionadas com a divisão, alongamento e diferenciação celular. O transporte polar regula os níveis de auxinas na planta e encontra-se envolvido no desenvolvimento do tecido do xilema. A distribuição da concentração das auxinas revela-se assimétrica nas células adjacentes do xilema (células do periciclo) durante o restabelecimento do enxerto. Relativamente às funções associadas às citocininas é referido que estas participam na regulação de processos de divisão celular, crescimento do ápice, desenvolvimento do sistema vascular e crescimento das raízes. Estão envolvidas no desenvolvimento da união do enxerto através da estimulação da proliferação do *callus* no local da união dos tecidos, ocorrendo a sua biossíntese nos processos regenerativos das lesões dos tecidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Material Vegetal

Como porta-enxerto foram utilizados explantes do híbrido ‘Paradox’ (*J. hindsii* x *J. regia*) cl. ‘Vlach’ (Figura 1 A), com um mínimo de 4 cm de altura e 4 a 6 folhas desenvolvidas. Os explantes encontram-se estabelecidos em câmara de cultura *in vitro* em condições de assepsia de acordo com os procedimentos descritos por Carlos (2014).

Relativamente ao enxerto, foi utilizada *J. regia* cv. ‘Chandler’ com altura entre de 3 a 5 cm e 4 a 6 folhas desenvolvidas (Figura 1B). As condições de cultura são idênticas às referenciadas para o cl. ‘Vlach’.

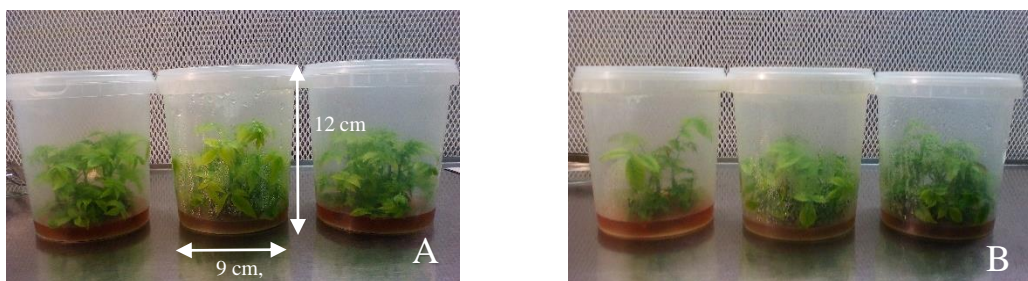


Figura 1. Material vegetal utilizado na microenxertia: (A) Porta-enxerto do híbrido ‘Paradox’ (*J. hindsii* x *J. regia*) cl. ‘Vlach’; (B) Enxerto de *J. regia* cv. ‘Chandler’.

3.1.2. Meios de cultura

O meio de cultura utilizado na fase de multiplicação, para o cl. ‘Vlach’, e para a cv. ‘Chandler’, foi o meio basal DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) com micronutrientes 1,5x, com 96 mg L⁻¹ de Fe-EDDHA, adicionado de 1mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de AIB, 30 g L⁻¹ de sacarose, 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 1 mg L⁻¹ de PPM e 2,5 g L⁻¹ de Gelgum®, sendo o pH ajustado a 5,5 antes da autoclavagem.

O meio de cultura utilizado para a indução radical do clone ‘Vlach’ consistiu na formulação DKW com ½ macronutrientes, 96 mg L⁻¹ de Fe-EDDHA, adicionado de 3 mg L⁻¹ de AIB, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,5 g L⁻¹ de Gelgum®, sendo o pH ajustado a 5,5 antes da autoclavagem.

3.1.3. Substratos/contentores de multiplicação, enraizamento e aclimatização

Os substratos utilizados para a 1ª fase de aclimatização *ex vitro* foram os substratos orgânicos comerciais Jiffy® Preformas V8-Y, irradiados (Figura 2A). Para a segunda fase

de aclimatização foram utilizados os substratos Jiffy® Grow Block, de dimensões 50x50x50mm (Figura 2B).

Para a fase de multiplicação de cultura *in vitro* foram utilizadas caixas de polipropileno SAC O2 ® O118/120+OD118 autoclaváveis e reutilizáveis com um volume de 0,870 L.

Para a fase de indução radical utilizaram-se caixas de polipropileno SAC O2 ® OV80+OVD80 autoclaváveis e reutilizáveis com um volume de 0,540 L.

Para as fases de enraizamento e aclimatização foram utilizadas respectivamente caixas de polipropileno SAC O2 ® TP3000+TPD3000, com capacidade para 20 unidades de Jiffy® Preformas e SAC O2 ® TP4000+TPD4000, com volumes respectivamente de 3 L e 4 L, com capacidade para 9 unidades de Jiffy® Grow Block, Coco RHP.

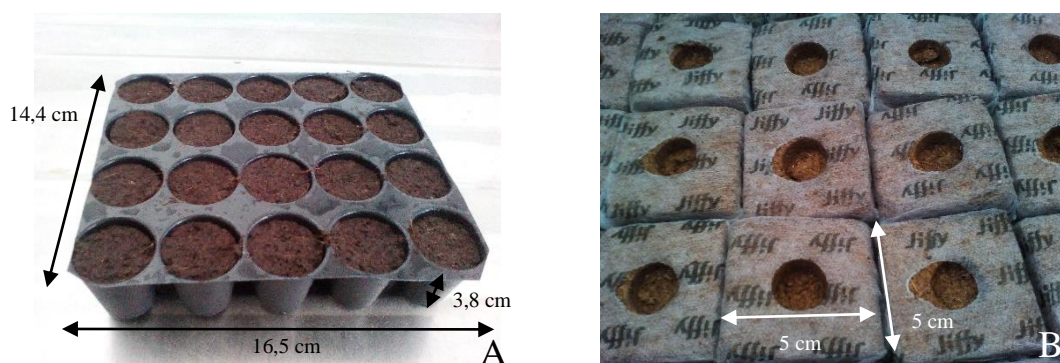


Figura 2. Substratos orgânicos utilizados na fase de enraizamento. (A) Jiffy® Preformas irradiados V8-Y; (B) Jiffy® Grow Block, Coco RHP.

3.2. Métodos

Os procedimentos laboratoriais associados à propagação *in vitro*, enxertia e aclimatização decorreram no laboratório de melhoramento e biotecnologia vegetal da Universidade de Évora.

O protocolo adoptado para a obtenção de plantas microenxertadas considerou as seguintes etapas:

- 1ª Multiplicação e indução radical do porta-enxerto *J. hindsii* x *J. regia* cl. 'Vlach'
- 2ª Multiplicação de *J. regia* cv. 'Chandler'
- 3ª Microenxertia de *J. regia* cv. 'Chandler' em *J. hindsii* x *J. regia* cl. 'Vlach'
- 4ª Enraizamento e aclimatização das plantas

Os procedimentos relacionados com a testagem relativa à presença do CLRV decorreram no laboratório de virologia vegetal da Universidade de Évora.

3.2.1. Preparação dos meios de cultura *in vitro*

Os frascos e as tampas de polipropileno destinados à fase de multiplicação e enraizamento foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C durante 50 minutos.

Para a preparação dos meios de cultura adicionaram-se, num balão volumétrico de 5000 ml, água destilada juntamente com as diferentes soluções mãe de macronutrientes DKW, micronutrientes DKW, Fe-EDHHA, vitaminas DKW, reguladores de crescimento, sacarose, myo-inositol, caseína e PPM, agitando a solução com um agitador magnético. Perfez-se o volume do balão volumétrico, transferiu-se para um copo graduado e ajustando-se o pH a 5,5. Depois transferiu-se a solução para Erlenmeyers de 1000 ml contendo o gelificante Gelam Gum®. A solução foi esterilizada em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

A distribuição dos meios de cultura de multiplicação e enraizamento foi realizada em condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar horizontal. O meio foi distribuído nas caixas, contendo cada uma, aproximadamente 90 ml no caso do meio de multiplicação, e de 80 ml no caso do meio de enraizamento.

3.2.2. Esterilização e desinfecção de materiais

Os protocolos associados à distribuição de meio de cultura, etapas de preparação do material vegetal relacionado com a multiplicação, indução radical e enxertia foram efectuados em condições de assepsia em câmara de fluxo laminar horizontal.

O material de corte e manuseamento dos explantes (pinças, bisturis) foi desinfectado depois da sua utilização pela imersão em álcool a 70° e esterilização por temperaturas a 250 °C, utilizando um esterilizador de esferas de vidro, mantendo os instrumentos no esterilizador num período mínimo de dois minutos. Para a garantia das condições de assepsia, foi utilizado o etanol a 70° para a desinfecção das mãos e da mesa de fluxo laminar. Nas repicagens e operações de enxertia, o material vegetal foi preparado em cima de folhas de papel esterilizadas em estufa a 180 ° C, durante 120 minutos.

3.2.3. Condições de cultura

Os explantes do híbrido ‘Paradox’ cl. ‘Vlach’ e *J. regia* cv. ‘Chandler’ colocados em meio DKW, foram mantidos em câmara de crescimento (Walkin, Aralab®) entre 30 a 45 dias, em função da evolução do alongamento dos explantes. As condições de temperatura foram 24° com luz e 22°C no escuro. O fotoperíodo compreendeu 16 h de luz, garantido

por lâmpadas fluorescentes Osram L 36W/840 branco frio, com uma intensidade luminosa de $110 \pm 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após avaliação visual, foram separados os melhores explantes para passarem à fase de indução radical, utilizando-se os restantes para reiniciar a fase de multiplicação. Na fase da indução radical, permaneceram nos meios de indução por um período de 7 dias no escuro, colocados em câmara de crescimento com uma temperatura constante de 22°C.

3.2.4. Procedimentos de enraizamento, enxertia e aclimatização

As operações de microenxertia efectuaram-se em câmara de fluxo laminar horizontal, mas sem necessidade de garantir condições de assepsia, utilizadas na manipulação dos explantes quando se destinam para a cultura *in vitro*. Este correspondeu ao momento da transferência de condições *in vitro* para condições *ex vitro*.

A cv. ‘Chandler’ foi retirada do meio de multiplicação DKW e o cl. ‘Vlach’ foi retirado do meio de enraizamento após 7 dias no escuro. A escolha do material a enxertar implicou a escolha por observação visual dos explantes, de modo a que os diâmetros de enxerto e porta-enxerto fossem semelhantes (Figura 3).



Figura 3. Aspecto da selecção dos explantes da cv. ‘Chandler’ destinados à enxertia.

O enxerto foi cortado com bisturi com cerca de 4-5 cm de comprimento contendo cerca de 2 a 3 pares de folhas, tendo sido feito um corte em forma de V. O porta-enxerto foi decapitado no ápice, ficando com aproximadamente 3 cm (cerca de $\frac{1}{3}$ do explante) sendo efectuado um golpe vertical, de modo a permitir a enxertia de fenda com incrustação de

topo. Após o enxerto previamente preparado, este foi inserido na fenda do porta-enxerto, denominada enxertia de fenda com incrustação de topo (Figura 4).

No ensaio I, no tratamento 1 e 4 foram mantidos no porta-enxerto entre 3 a 4 folhas, e no caso dos tratamentos 2 e 3, as folhas foram removidas.



Figura 4. Aspecto da enxertia em fenda com incrustação de topo da cv. 'Chandler' com folhas no porta-enxerto cl. 'Vlach' sem folhas.

A união foi efectuada com recurso a pinças de microenxertia Brinkman, modelo PT3 Ø 2,5 mm.

Para a primeira fase de aclimatização, os microenxertos foram seguidamente colocados a enraizar em Jiffy® Preformas, sendo que, na primeira fase de enraizamento e pegamento de enxertia, foram colocados 20 plantas microenxertadas por caixa.

As caixas foram acondicionadas em câmara crescimento de plantas (Fitoclima S600, Aralab®) com as condições de temperatura de luz e escuro respectivamente, 26°C e 28°C. O fotoperíodo foi 16 horas de luz, com intensidade luminosa de $100 \pm 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ emitida por lâmpadas fluorescentes Osram L 36W/840 branco frio.

O início da segunda fase de aclimatização, ocorreu 30 dias após a enxertia (30 DAE), tendo sido seleccionadas as plantas apresentando pegamento do enxerto e com raízes (Figura 5) e as plantas com pegamento do enxerto e sem raízes visíveis no exterior do Jiffy® Preformas.



Figura 5. Planta microenxertada apresentando pegamento do enxerto e raízes.

Nesta fase, as plantas foram transferidas para o substrato Jiffy® Grow Block colocadas em caixas de propileno SAC O2 ® TP3000+TPD4000 envoltas em filme plástico. Ao longo da segunda fase, o filme plástico foi progressivamente aberto de modo a permitir a aclimatização gradual das plantas.

Durante 15 dias, foram mantidas as mesmas condições ambientais da primeira fase. No início da segunda metade desta fase as caixas foram transferidas e mantidas durante 15 dias em câmara de crescimento (Fitoclima 12000 PHL, Aralab®). As temperaturas de luz e escuro foram respectivamente 26 e 28°C. A humidade relativa manteve-se constante em redor dos 80%. O fotoperíodo foi 16 horas de luz com uma intensidade luminosa de 210 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ garantido por lâmpadas fluorescentes Osram L 36W/840 branco frio.

No fim da segunda fase, e aos 60 DAE, foram contabilizadas as percentagens de sucesso da aclimatização.

De seguida, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos de 0,65 L contendo como substrato, fibra de coco, perlite e vermiculite com uma proporção de 80/10/10 %. Neste momento, a planta considerou-se aclimatizada e pronta a prosseguir para condições de estufa (Figura 6).



Figura 6. Plantas envasadas e aclimatizadas no fim dos ensaios, aptas a prosseguir para condições de estufa.

3.2.5. Detecção de *Cherry leaf roll virus* em material vegetal de noqueira

3.2.5.1. Inoculação mecânica do controlo positivo

Para a obtenção do controlo positivo de CLRV, foi feita a inoculação mecânica em plantas de *Nicotiana benthamiana* utilizado material vegetal liofilizado de noqueiras infectadas com o vírus. Este material vegetal é proveniente dos EUA, foi gentilmente cedido pelo Dr. Mysore Sudarshana de UC Davis, EUA.

Para a inoculação mecânica, foram macerados num almofariz de porcelana, os tecidos liofilizados de noqueira, em tampão 0,05 M fosfato de sódio, pH 6,0, e do abrasivo carborundo. O extracto resultante foi inoculado mecanicamente nas folhas de *N. benthamiana*. Estas foram mantidas durante 2 semanas, numa sala com a temperatura controlada (22-25°C) e fotoperíodo de 14 h garantida com lâmpadas fluorescentes.

3.2.5.2. Recolha e preparação das amostras de material vegetal do género *Juglans*

Foram recolhidas amostras de limbos das folhas de plantas do género *Juglans* de diferentes proveniências. A tabela 4 apresenta a proveniência da origem do material testado. O material testado com os códigos CV e VV encontra-se estabelecido *in vitro*, e o material com os códigos CVE e CAP respectivamente, localizado em estufa e pomar é

resultante de plantas propagadas provenientes de material estabelecido *in vitro*, sendo que todo este material é de origem clonal. O material com o código CVP é proveniente de pomar com enxertos de origem desconhecida.

A testagem para a presença do CLRV incidiu em dois controlos positivos, o material de noqueira infectado liofilizado e de *N. benthamiana* inoculada mecanicamente e o material vegetal em análise, originário de cinco proveniências (duas amostras de campo, uma amostra de estufa e duas amostras de cultura *in vitro*), com quatro repetições por proveniência, como se indica na tabela 4. O material para análise por proveniência foi recolhido aleatoriamente de vários indivíduos formando uma amostra composta e também aleatoriamente foram retiradas quatro fracções dessas amostras constituindo-se assim as quatro repetições (réplicas biológicas) de cada proveniência analisada.

Tabela 4. Material vegetal testado para a presença de CLRV.

Código	Material vegetal	Proveniência
CLR	Material vegetal liofilizado de <i>J. regia</i> infectada com CLRV	Controlo positivo UC Davis (EUA)
Nb	<i>N.benthamiana</i> inoculada com material vegetal liofilizado infectado	Controlo positivo (Lab. Virologia)
CV	<i>J. regia</i> cv. ‘Chandler’ estabelecida em cultura <i>in vitro</i>	(C. crescimento)
VV	<i>J. regia</i> x <i>J. hindsii</i> cl. ‘Vlach’ estabelecido em cultura <i>in vitro</i>	(C. crescimento)
CVE	<i>J. regia</i> cv. ‘Chandler’ enxertada em <i>J. regia</i> x <i>J. hindsii</i> cl. ‘Vlach’	(Estufa, Mitra)
CAP	<i>J. regia</i> cv. ‘Chandler’ autoenraizada	(Pomar, Espanha)
CVP	<i>J. regia</i> cv. ‘Chandler’ enxertada em <i>J. regia</i> x <i>J. hindsii</i> cl. ‘Vlach’	(Pomar, Espanha)

Cada repetição consistiu em cerca de 10 g de material vegetal fresco, tendo sido macerado num almofariz com azoto líquido, e posteriormente conservado a -80°C até à sua análise.

3.2.5.3. Extracção do RNA total

A extracção do RNA total foi feita com a utilização das colunas do “RNeasy® Plant Mini Kit” de acordo com as instruções do fabricante. As centrifugações efectuadas durante o processo de extracção foram feitas numa centrífuga de bancada refrigerada

modelo “Himac CT15RE da Hitachi Koki Co. Lda”. A quantificação RNA total foi determinada no equipamento para quantificar ácidos nucleicos “Quawell Q9000 Micro-volume Spectrophotometers DNA/Protein analyzer”.

3.2.5.4. Protocolo de RT-PCR para o diagnóstico de CLRV

De cada RNA extraído foram utilizados 2 µl para a síntese do cDNA, o Kit utilizado foi o “Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR”, de acordo com as instruções do fabricante, tendo as incubações sido efectuadas no equipamento “Thermo Statplus” da Eppendorf®.

A reacção de amplificação (PCR), num volume total de 50 µl foi realizada num termociclador “BioRad My Cycler ®Thermal cycler - BioRad”, em que foram utilizados 2 µl de cDNA obtidos da reacção de transcrição reversa anterior, juntamente com 10 mM Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Fermentas, Waltham, MA, USA), 0,25 µM de cada ‘primer’ nomeadamente, ‘CLVR-1F’ e ‘CLRV2R’ (Pantaleo et al., 2001) e 2,5 U DreamTaq DNA polymerase (Fermentas, Waltham, MA, USA). As condições de temperatura da reacção foram: 95 °C durante 2 min, sendo seguida de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C e 1 min a 72°C, tendo a extensão final sido feita durante 10 min a 72°C.

Vinte µl dos produtos amplificados foram submetidos a electroforese em gel de agarose 0,8%, preparado em tampão TBE 0,5x (1x: 1M Tris-HCl, 0,83 M ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 7) com o corante GreenSafe Premium (NZYTech). Como referência, utilizaram-se marcadores com peso molecular conhecido (‘DNA Ladder 1kb plus’, GIBCOBRL). A electroforese decorreu à voltagem constante de 90 V, a 33 miliamperes durante uma hora. O resultado da electroforese foi observado num sistema de aquisição de imagem “Smart 5 VWR®”, tendo sido recolhidas as imagens da amplificação das bandas de tamanho esperado para a presença do CLRV com 431 pares de bases.

3.3. Delineamento experimental e análise de dados

Foi testada a enxertia de garfo em fenda com incrustação de topo, onde se analisou a influência da presença ou ausência de folhas no enxerto e/ou no porta-enxerto, para o sucesso da enxertia englobando o conjunto dos ensaios I e II.

3.3.1. Ensaio I e II

O objectivo do ensaio I foi o desenvolvimento da técnica de microenxertia para avaliar o enraizamento e pegamento dos enxertos, sendo a variável em estudo a presença ou ausência de folhas no enxerto e no porta-enxerto, na sua influência para o sucesso da técnica.

Foram delineados quatro tratamentos de acordo com as combinações apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Tratamentos de enxertia com as combinações para a presença ou ausência de folhas.

Tratamento	Combinação enxerto/porta-enxerto
T1	Cv.'Chandler' sem folhas/clone 'Vlach' com folhas
T2	Cv.'Chandler' com folhas/clone 'Vlach' sem folhas
T3	Cv.'Chandler' sem folhas/clone 'Vlach' sem folhas
T4	Cv.'Chandler' com folhas/clone 'Vlach' com folhas

O ensaio I foi instalado da seguinte forma:

1 cultivar x 1 porta-enxerto x 4 níveis do factor em estudo x 6 repetições

(Uma repetição corresponde a 10 plantas)

Relativamente ao ensaio II, este teve como objectivo confirmar as taxas de sucesso obtidas com o melhor tratamento utilizado no primeiro ensaio e consistiu na microenxertia de uma maior quantidade de plantas em várias repetições ao longo de um período de tempo definido de quatro meses.

Os ensaios consistiram na repetição do tratamento quatro do ensaio I, enxertando *J. regia* cv.'Chandler' com folhas no porta-enxerto 'Paradox'cl.'Vlach' com folhas.

O ensaio II foi instalado da seguinte forma:

1 cultivar x 1 porta-enxerto x 5 tempos de enxertia x 3 repetições

(Uma repetição corresponde a uma caixa com 20 plantas)

A análise de dados foi efectuada recorrendo ao programa STATISTICA 12.0. Todos os dados recolhidos foram submetidos a análise de variância, seguida de análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), com as diferenças significativas a serem registadas para valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaios I e II

Foi avaliada a influência da presença ou da ausência de folhas no enxerto e porta-enxerto, relativamente à capacidade de enraizamento deste último e ao sucesso da enxertia. Como referido em materiais e métodos, a enxertia foi realizada em simultâneo com o enraizamento, na transição das condições *in vitro* para *ex vitro*.

No caso do ensaio I, as observações sobre as taxas de pegamento da enxertia e enraizamento do porta-enxerto foram realizadas 30 DAE, enquanto a taxa de sucesso das plantas aclimatadas foi realizada aos 60 DAE.

Os resultados relativos ao sucesso da enxertia e ao enraizamento apresentam-se nas figuras 7 e 8 respectivamente.

Verifica-se que ocorreram casos de sucesso de enxertia em três dos quatro tratamentos em análise (Figura 7).

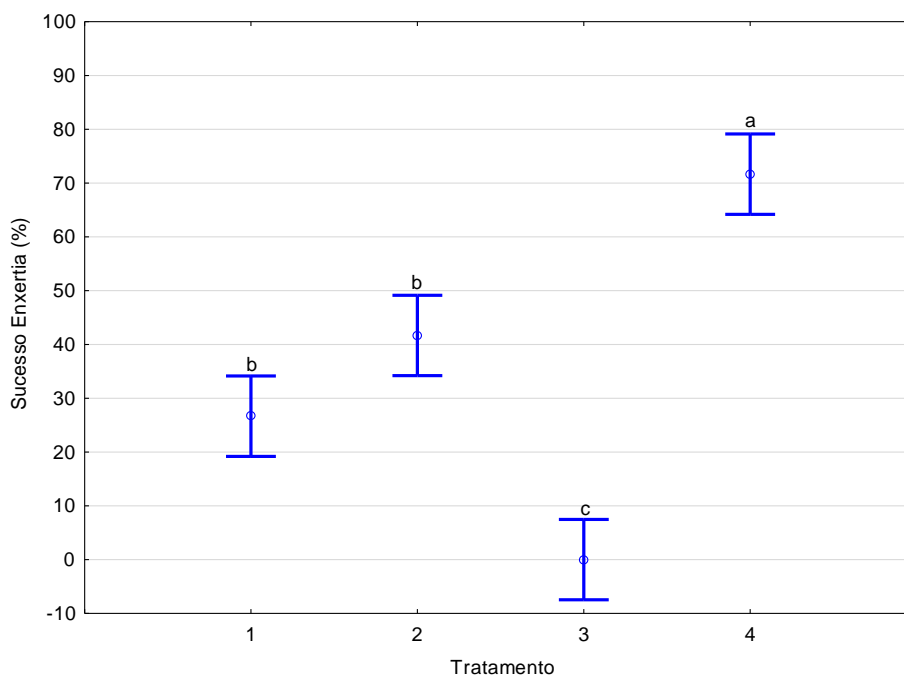


Figura 7. Comparação do sucesso da enxertia nos diferentes tratamentos do ensaio I. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogêneos para $p \leq 0,05$.

Os melhores resultados foram obtidos no tratamento 4 (enxerto e porta-enxerto com folhas), com 71,6% de sucesso da enxertia com diferenças significativas para os restantes

tratamentos. Nos tratamentos 1 e 2, as percentagens de sucesso, foram respectivamente 26,6 e 41,6 %, sem diferenças significativas entre si, enquanto no tratamento 3, sem folhas nem no enxerto nem no porta-enxerto, não se conseguiu qualquer enxertia viável.

Parece assim evidente que a presença de folhas, no enxerto ou no porta-enxerto, ou em ambos, foi um requisito obrigatório para a ocorrência do pegamento da enxertia, sendo de destacar que, a presença de folhas em simultâneo no conjunto do enxerto e do porta-enxerto, aumentou a eficiência do processo.

Num protocolo de enxertia com algumas semelhanças ao tratamento 2, Liu et al. (2017) utilizando porta-enxertos ‘Paradox’ transformados geneticamente com um gene repórter para avaliação da transmissão de material genético entre biontes, realizaram a enxertia em fenda utilizando enxertos com folhas e porta-enxertos sem folhas. Após a realização da enxertia em condições assépticas, as plantas foram colocadas novamente em meio de cultura, sendo que o pegamento da enxertia foi avaliado após 4 semanas. O *callus* iniciou o seu desenvolvimento 3-4 DAE. A percentagem de pegamento foi quase 95%. Nos dados aqui apresentados, o tratamento 2 (enxerto com folhas e porta-enxerto sem folhas) apresentou uma percentagem de sucesso de 41,6%, bastante inferior aos obtidos por Liu et al., (2017). No caso do trabalho destes autores, a percentagem mais elevada de pegamento poderá ser explicada, porque, nesse caso apenas ocorre o processo fisiológico de reconstituição dos feixes vasculares, ao contrário das condições dos presentes ensaios, em que decorre simultaneamente o processo de formação de raízes adventícias. Deste modo, há uma distribuição da energia do metabolismo fisiológico repartido por estes dois processos. Existiram casos nos tratamentos 1 e 4, em que não ocorreu o pegamento da enxertia, apesar dos porta-enxertos continuarem viáveis e mantendo os processos fisiológicos de enraizamento. Uma das explicações possíveis do insucesso poderá dever-se à inexistência ou baixa produção de *callus* de cicatrização, fundamental para o sucesso do pegamento, interrompendo o processo de reconstituição das lesões causadas no momento da enxertia.

Neste processo, ocorrem resumidamente, os eventos que seguidamente se descrevem. Após a lesão causada pelo corte, as células rompidas colapsam e as células intactas próximas ao enxerto, unem-se. Formam-se polissacarídeos, incluindo pectinas na união do enxerto, surgindo novas células de parênquima, produzindo o *callus*, preenchendo o espaço entre os dois componentes. Não se completando este processo integralmente, a enxertia não tem sucesso (Hartmann et al., 2014).

Uma razão associada a este insucesso poderá ser a inadequada união no ponto de enxertia, sem que os tecidos cambiais do enxerto e porta-enxerto estejam adequadamente interligados, tendo como consequência, a interrupção do processo da sequência de eventos de reconstituição celular atrás referida.

Outra razão poderá ser de ordem fisiológica. De acordo com o trabalho de Farsi et al. (2016) em enxertia de nogueira, existem diferenças na actividade fisiológica do enxerto e porta-enxerto. Estes autores analisaram os eventos que ocorrem durante o processo de união do enxerto da cv. 'Chandler', em enxertias de garfo durante o período de repouso vegetativo, com o objectivo de identificar problemas associados a falhas na enxertia. Foi verificada uma maior actividade de formação de células de *callus* no lado do porta-enxerto e que no fim do período de trinta dias, as falhas de pegamento observadas, estavam relacionadas com uma baixa produção do *callus* de cicatrização.

Relativamente ao enraizamento, foi avaliado o sucesso deste processo no total dos explantes (Figura 8), considerando as situações de pegamento e não pegamento do enxerto.

Observam-se diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos cujos porta-enxertos continham folhas e os que não continham. Os melhores resultados ocorreram nos tratamentos 1 e 4 em que os porta-enxertos tinham folhas com valores totais de enraizamento, respectivamente de 90 e 81,6 %. No caso do tratamento 2 sem folhas no porta-enxerto a percentagem de enraizamento foi 26,6 % com diferenças estatisticamente significativas para o tratamento 3, onde não ocorreu enraizamento e para os tratamentos 1 e 4.

No caso do tratamento 1, a percentagem de pegamento do enxerto foi de 26,6 % e de enraizamento de 90 %, significando que, apesar das baixas taxas de pegamento, a maioria dos porta-enxertos enraizou. Apesar de não ter ocorrido o pegamento da enxertia, o porta-enxerto manteve-se viável, mantendo o seu crescimento, prosseguindo para fase de aclimatização, possibilitando assim a sua posterior utilização para enxertia em condições de viveiro ou local definitivo. Uma eventual explicação para os resultados obtidos nos casos em que há presença de folhas no porta-enxerto, poderá dever-se ao facto de, do ponto de vista fisiológico, haver uma tendência para favorecer os processos de enraizamento, que já tinham sido iniciados na fase anterior da indução radical, em detrimento do processo de reconstrução do *callus* de enxertia, fundamental para o pegamento da mesma.

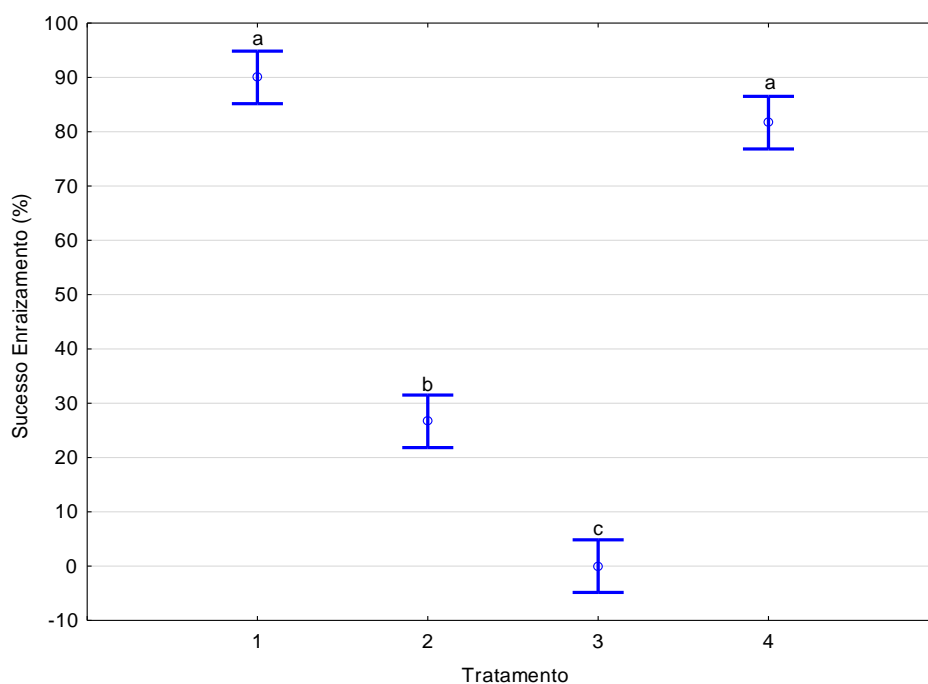


Figura 8. Comparação do sucesso do enraizamento nos diferentes tratamentos do ensaio I. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogêneos para $p \leq 0,05$.

Deve ainda destacar-se que, no tratamento 2, não ocorreu enraizamento do porta-enxerto nas situações em que a enxertia não vingou, o que parece demonstrar e reforçar a importância da existência de folhas no porta-enxerto para que ocorra o enraizamento deste.

No caso do tratamento 3, também não existiu enraizamento, confirmando que, neste caso, a presença de folhas era fundamental para a continuidade dos processos fisiológicos de formação de raízes adventícias.

No tratamento 4, há casos de explantes em que a enxertia pegou, mas em que não havia raízes no porta-enxerto na altura das observações aos 30 DAE tendo enraizado posteriormente. Deste modo, verificou-se um atraso no aparecimento das raízes comparativamente aos padrões normais observados em ensaios prévios de enraizamento dos porta-enxertos, que é de cerca de 21 a 28 dias após a indução (dados não apresentados).

Relativamente à aclimatização foi avaliada a taxa de sucesso aos 60 DAE (Figura 9). Apenas foram incluídos na análise explantes dos tratamentos 1, 2 e 4, já que, no

tratamento 3, se verificou ter ocorrido uma mortalidade de 100% e por isso não seguiram plantas para esta fase.

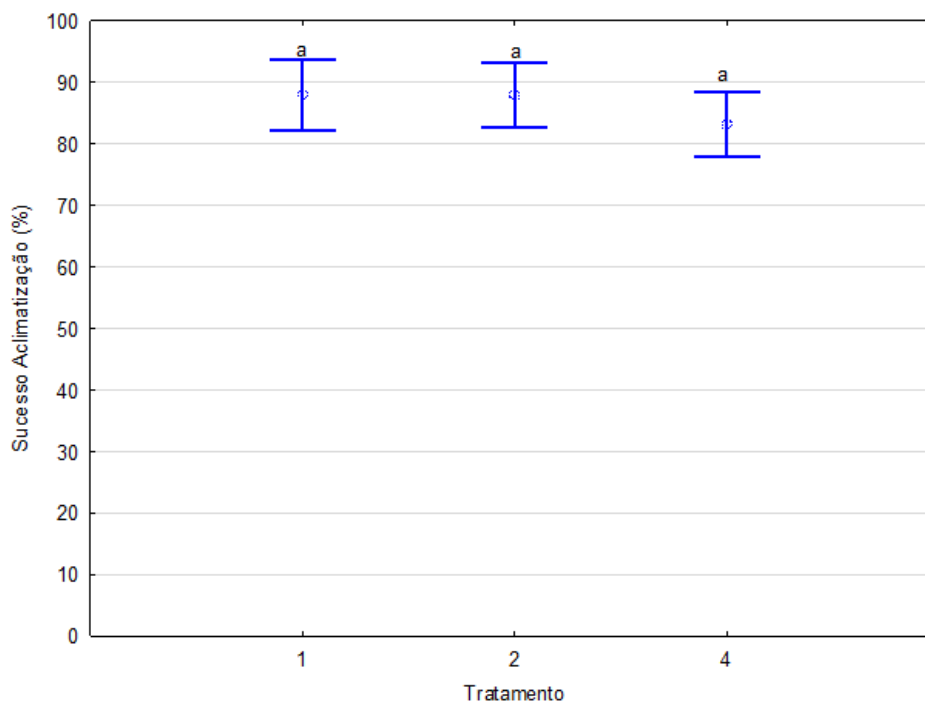


Figura 9. Comparação do sucesso da aclimatização aos 60 DAE nos diferentes tratamentos no ensaio I. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogêneos para $p \leq 0,05$.

Os melhores resultados obtiveram-se nos tratamentos 1 e 2 com 88% de sucesso seguidos do tratamento 4 com 83,2%. A taxa média de sucesso rondou os 86,4 %, sem diferenças significativas entre os tratamentos.

O sucesso obtido nesta fase está relacionado com vários aspectos, destacando-se as condições relacionadas com o processo de enraizamento e as condições de aclimatização.

No que respeita ao processo de enraizamento na subfase de expressão radical, há dois métodos possíveis, por exemplo, um deles considera condições de enraizamento *in vitro*, como no trabalho de Jay-Allemand et al. (1992), e o outro, considera condições enraizamento *ex vitro*, tal como proposto por Carlos (2014).

No caso dos presentes ensaios, logo após a prática da microenxertia, os explantes foram colocados em enraizamento num substrato orgânico com a adopção do procedimento de enraizamento *ex vitro*, para que a expressão radical decorra em

condições de raiz protegida. Neste momento, ocorre a primeira mudança associada à transição das condições *in vitro* para *ex vitro*, e em que o material vegetal deixa de estar em condições de assepsia total. Os explantes transitam para condições mais próximas daquelas vão encontrar em condições de estufa ou exterior. O enraizamento *ex vitro*, neste caso apresenta-se com uma vantagem substancial, comparativamente aos processos clássicos de enraizamento *in vitro*. Com a utilização de um substrato orgânico que garante a protecção da raiz à medida que decorre a expressão radical, é antecipado o processo de aclimatização comparativamente ao processo de enraizamento *in vitro* com raiz desprotegida, como proposto por Jay-Allemand et al. (1992). Por exemplo, no método proposto por estes autores, com a utilização da combinação de vermiculite e meio gelificado com DKW, há o grande inconveniente de manipular as plantas enraizadas com a raiz desprotegida, aumentando os riscos de danos e perdas na transferência para as condições de viveiro ou para o envasamento. Poderá especular-se que, caso se utilizem métodos de enraizamento *in vitro* com raiz desprotegida, que a técnica apresentada neste trabalho, seja inviável, devido à sensibilidade do género *Juglans* no que diz respeito à manipulação e exposição das raízes aquando das transições realizadas na fase de aclimatização.

Relativamente às condições ambientais, deve destacar-se que a aclimatização é uma das fases mais sensíveis dos processos de obtenção de nogueiras com técnicas de cultura *in vitro* (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011). As dificuldades na aclimatização das plantas nesta fase estão relacionadas com as características morfológicas das folhas, como a menor espessura da epiderme, maior densidade de estomas por unidade de área de folha e maior abertura estomática, com taxas de transpiração altas, implicando uma elevada susceptibilidade à desidratação das folhas (Vahdati & Aliniaefard, 2017).

Aliadas a estas dificuldades, adicionam-se as exigências ambientais necessárias ao sucesso da enxertia, pois a técnica utilizada nos ensaios é executada na fase crítica de transição das condições *in vitro* para as condições *ex vitro*. Deste modo, o controlo das condições ambientais adequadas é fundamental para o sucesso na aclimatização das plantas microenxertadas.

No caso dos presentes ensaios, a utilização de caixas que foram progressivamente abertas no interior das câmaras de crescimento com controlo de temperatura, humidade e fotoperíodo permitiu a estabilidade das condições ambientais, evitando a desidratação das folhas. Assim, foi garantida uma transição adequada das condições *in vitro* para condições *ex vitro*, após o fim da primeira fase de aclimatização (30 DAE) em que as caixas

permaneceram fechadas com elevadas condições de humidade relativa. Este procedimento permitiu uma percentagem de aclimatização eficiente aos 60 DAE com uma média 86,4 % de sucesso.

Com o objectivo de validar os resultados obtidos no tratamento 4 (enxerto e porta-enxerto com folhas) do ensaio I, foram realizadas repetições temporais desse tratamento, (Ensaio II) tendo sido quantificado em cada tempo o sucesso da enxertia aos 30 DAE (Figura 10), e da aclimatização aos 60 DAE (Figura 11). Verificou-se que não existiram diferenças estatisticamente significativas nas repetições ao longo do tempo, sendo que os resultados de sucesso da enxertia variaram entre os 73,3 e os 91,6 % (Figura 10).

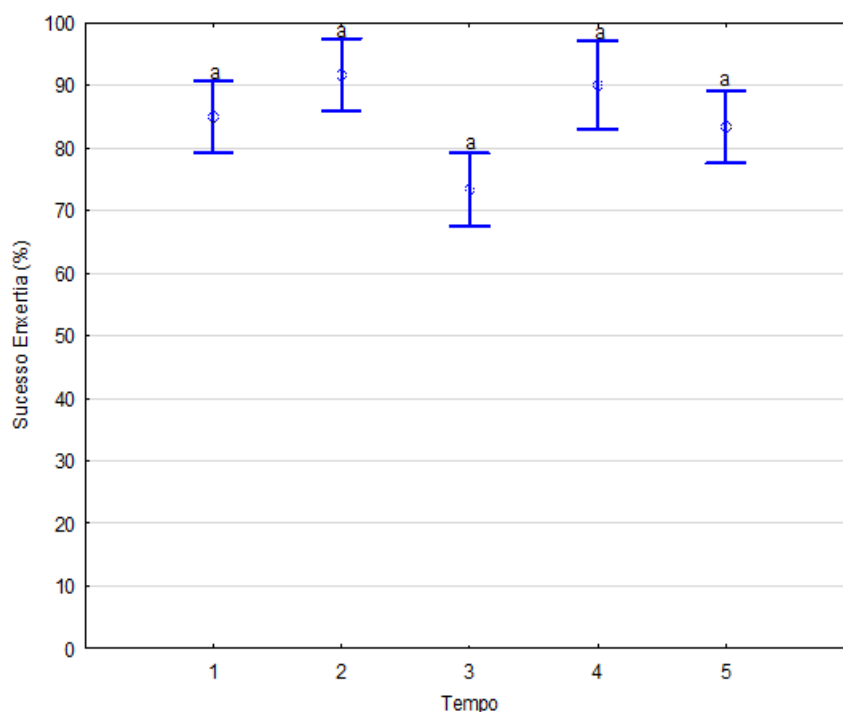


Figura 10. Comparação do sucesso da enxertia nos diferentes tempos no ensaio II. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogéneos para $p \leq 0,05$.

Os resultados médios globais de sucesso foram 84,6 %, e comparativamente ao resultado de referência de 71,6% do tratamento 4 do ensaio I, foram melhorados.

Relativamente à aclimatização aos 60 DAE (Figura 11), existiram apenas diferenças significativas entre a segunda e terceira repetição temporais, cujos motivos são desconhecidos uma vez que a metodologia de trabalho e as condições ambientais foram sempre idênticas e estáveis. O valor médio de aclimatização foi 76,3 %.

Comparativamente às técnicas tradicionais, os resultados obtidos com a técnica de microenxertia apresentaram estabilidade ao longo do período temporal em análise.

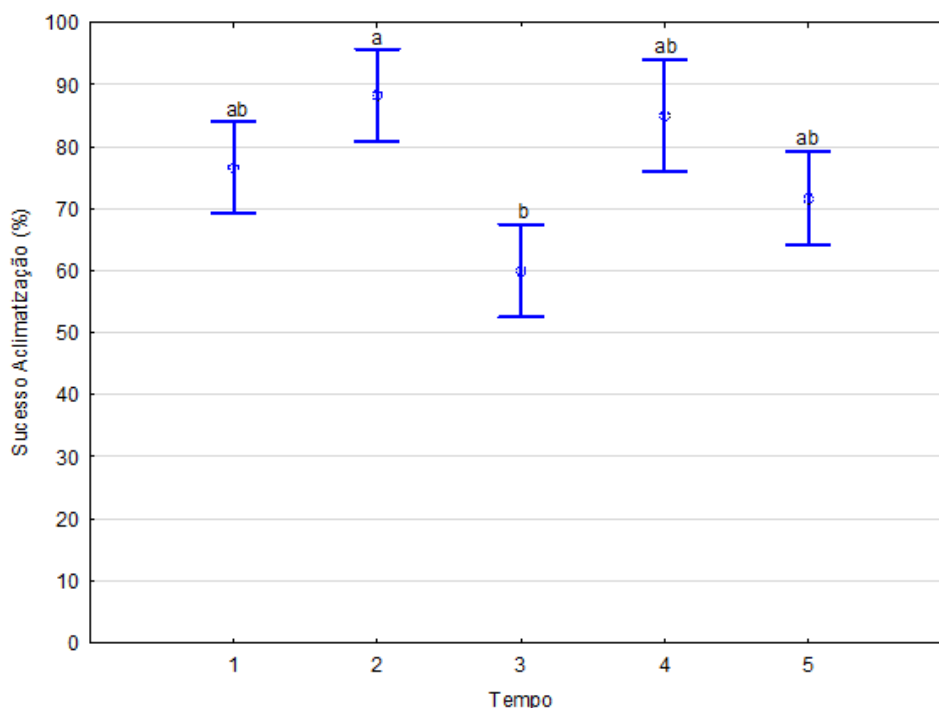


Figura 11. Comparação do sucesso da acclimatização ao 60 DAE nos diferentes tempos no ensaio II. As barras de erro representam os valores da média e desvio padrão, obtidos após a análise de variância. Letras diferentes obtidas após análise de comparação de médias pelo teste de Fisher (LSD), representam diferenças significativas entre grupos homogêneos para $p \leq 0,05$.

Os resultados globais de sucesso de enxertia de 84,6 % são superiores, por exemplo, aos resultados de enxertia de placa, com pegamentos de 16 % (Solar et al., 2001), da enxertia de gomo destacado, com 19% (Ebrahimi et al., 2007), da enxertia de garfo em cunha com taxas de 20 a 32% (Barut, 2001), da enxertia garfo em fenda inglesa realizada no campo, com valores entre 50 a 70% (Achim & Botu, 2001), e da enxertia ómega com 67 a 71 % (Dehghan et al., 2010).

Da aprendizagem associada a este processo, importa evidenciar alguns aspectos como a preparação do material para a enxertia e alguns requisitos e condições de trabalho necessárias.

Relativamente à preparação que os explantes seleccionados para a enxertia, estes deverão ter no mínimo 3 cm de comprimento, com um adequado distanciamento dos entrenós, que deve ser superior a 0,5 cm, porque, quando é efectuado o corte em V, a

presença de gomos muito perto uns dos outros, dificulta a operação, inviabilizando a existência de um corte regular.

Quanto aos requisitos e condições, deve ter-se em consideração que a microenxertia requer uma manipulação rápida e meticulosa de tecidos bastante sensíveis à desidratação e oxidação. Para o seu sucesso, a sua realização requer especialização e experiência.

O trabalho associado é condicionado por diversos aspectos relacionados com a envolvente do local de trabalho associados com a ergonomia, como por exemplo, as posturas do corpo nomeadamente as costas e os gestos repetitivos com a mão.

As condições de iluminação, assepsia e ruído no laboratório influenciam o desempenho do trabalhador que executa as operações de enxertia. As boas condições do local devem garantir o conforto, higiene e segurança do trabalhador. Os gestos repetitivos, o tempo de permanência sentado e o esforço da vista na execução de tarefas minuciosas, são as maiores condicionantes à execução de tarefas no fluxo laminar. Assim sendo, os protocolos devem ser simples, de modo a evitar gastos de tempo desnecessários em tarefas supérfluas.

A natureza do material herbáceo bastante sensível dos explantes de noqueira provenientes de condições *in vitro* requer a manipulação cuidadosa com as mãos exigindo aptidões associadas à concentração e à segurança dos gestos. Tal como referenciado por Obeidy & Smith (1991), a habilidade do operador é um dos factores mais importantes no sucesso da microenxertia.

Não foi objectivo deste trabalho a avaliação económica das operações, mas uma comparação dos custos de operação entre as técnicas tradicionais e as técnicas de laboratório, será um aspecto relevante futuro na opção de escolha para o método de enxertia mais eficiente, assim como para a determinação adequada do real custo de obtenção das plantas.

4.2. Testes de diagnóstico de *Cherry leaf rol virus* aplicados ao género *Juglans*

As inoculações resultantes do material liofilizado de noqueira infectada com CLRV em *N. benthamiana* mostraram sintomatologia sugestiva de infecção viral. Os sintomas observados evidenciavam necroses localizadas (Figura 12).



Figura 12. Em destaque, os sintomas de infecção com CLRV com necroses localizadas no limbo das folhas de *N. benthamiana*

Após a amplificação, verificou-se pela observação em gel de agarose, da banda com o tamanho esperado de cerca de 431 pb, correspondente aos controlos positivos, obtidos de material vegetal infectado (Figura 13).

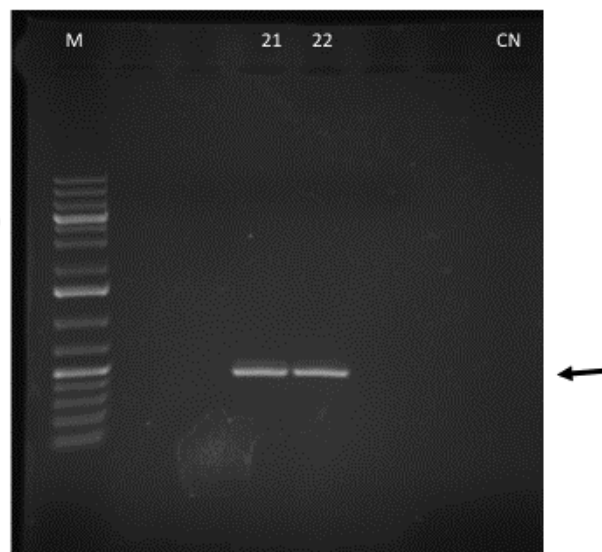


Figura 13. Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de isolados de CLRV: 21-CLRV, 22-Nb, CN- Controlo negativo de PCR. M – ‘DNA Ladder 1kb plus’ (GIBCOBRL). A seta indica a banda correspondente ao produto de amplificação esperado (431 pb).

Relativamente à quantificação de RNA total (Tabela 6), o material de consistência herbácea estabelecido *in vitro* apresentou maiores quantidades e melhor qualidade, verificada pelos valores da razão 260/280. Pelo contrário, o material originário de plantas mais lenhificadas estabelecidas em pomar, apresentou menores quantidades e pior qualidade.

Estes dados sugerem que a elevada quantidade de compostos fenólicos em tecidos lenhificados poderão dificultar o processo de extracção. Tendo-se verificado, em plantas de características mais herbáceas uma maior quantidade detectável para testes de diagnóstico para a presença de vírus. As folhas do género *Juglans* contêm quantidades elevadas de diferentes compostos fenólicos como ácidos fenólicos ou, naftoquinonas como é o exemplo da juglona (Cosmulescu et al., 2014), que são compostos que interferem numa boa extracção de RNA total.

Tabela 6. Quantificação de RNA total e razão ácido nucleico/proteína obtidos nas amostras de material vegetal de *Juglans* sp.

Material vegetal	Proveniência	RNA total $\eta\text{g}/\mu\text{L}$				Razão Ácido nucleico/Proteína 260/280			
CLRV	Controlo positivo UC Davis (EUA)								
N.b	Controlo positivo (Lab. Virologia, Mitra)								
CV	(C. crescimento, Mitra)	339	934	640	281	2,1	2,1	2	2,1
VV	(C. crescimento, Mitra)	26	288	261	187	1,8	2,1	2,1	2
CVE	(Estufa, Mitra)	153	107	20	68	2	2	2,2	2
CAP	(Pomar, Espanha)	72	24	18	13	2	1,9	1,6	1,7
CVP	(Pomar, Espanha)	34	20	17	26	1,8	1,7	1,7	1,8

Assim sendo, a probabilidade de detectar o RNA viral será maior em material vegetal de proveniente de cultura *in vitro* comparativamente ao proveniente de plantas já com características lenhosas.

Os resultados observados no gel de agarose, mostram a banda referente ao tamanho esperado de 431 pb para os controlos positivos, do material vegetal de noqueira liofilizado e de *N. benthamiana* infectada (Figuras 14 e 15). Quanto ao material vegetal de noqueira testado, das cinco proveniências que foram analisadas, surgiram seis amostras com resultado positivo (Tabela 7).

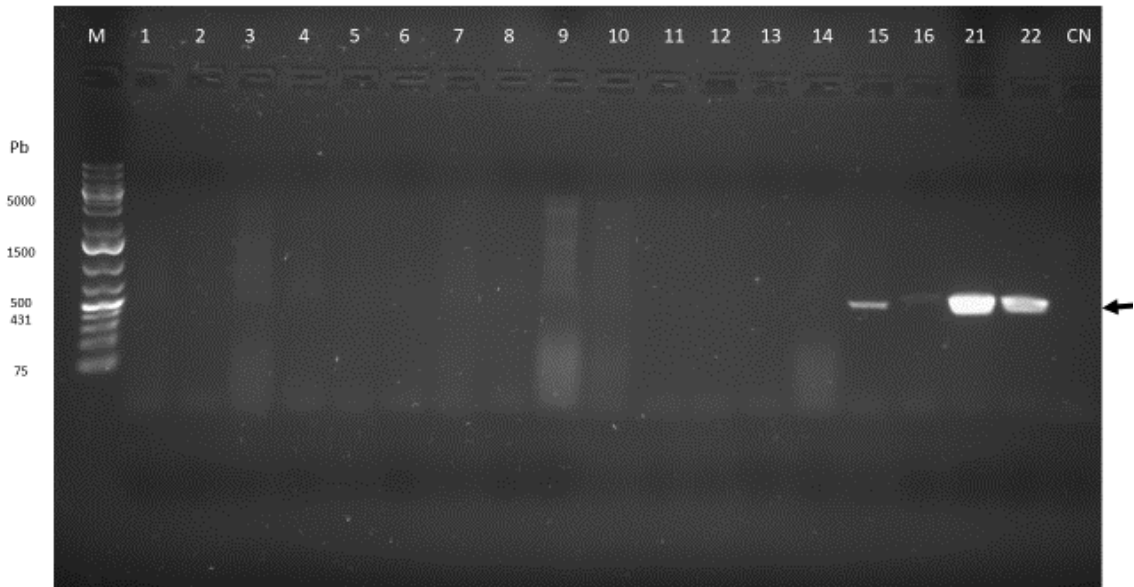


Figura 14. Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de isolados de CLRV:1-CVE1, 2-CAP,3-CV1, 4-VV1, 5-CVP1, 6- CVP2, 7-CVE2, 8-CAP2, 9-CV2, 10-VV2, 11-CVP3, 12- CVE3, 13- CAP3, 14- CV3, 15-CVE4, 16-CAP4, 21-CLRV,22-Nb, CN- Controlo negativo de PCR. M – ‘DNA Ladder 1kb plus’ (GIBCOBRL). A seta indica a banda correspondente ao produto de amplificação esperado (431 pb).

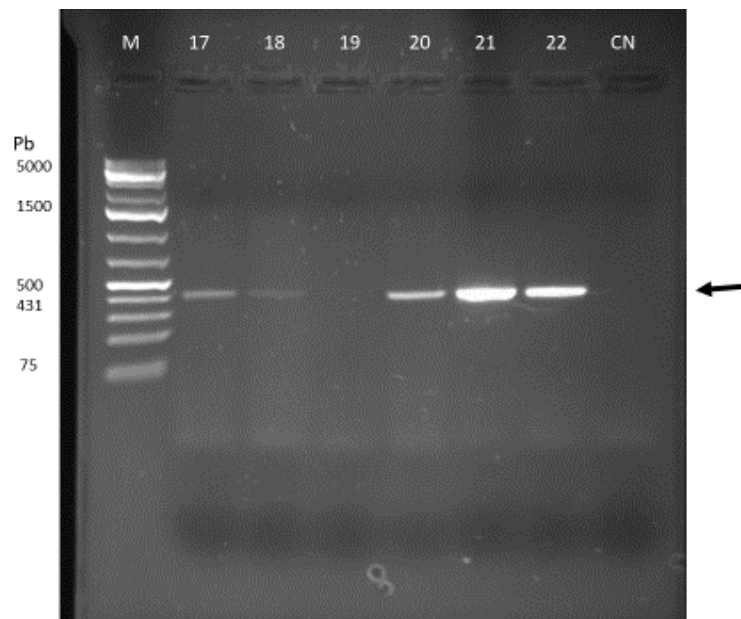


Figura 15. Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação de isolados de CLRV: 17-CV4, 18-VV3, 19- CVP4, 20-VV4, 21-CLRV, 22-Nb, CN- Controlo negativo de PCR. M – ‘DNA Ladder 1kb plus’ (GIBCOBRL).A seta indica a banda correspondente ao produto de amplificação esperado (431 pb).

Tabela 7. Resultados para a presença de CLRV no material vegetal de *Juglans* sp. testado.

Nº Amostra PCR	Abreviatura	Proveniência	Presença de vírus
1	CVE1	Estufa	-
2	CAP1	Pomar	-
3	CV1	C.Crescimento <i>in vitro</i>	-
4	VV1	C.Crescimento <i>in vitro</i>	-
5	CVP1	Pomar	-
6	CVP2	Pomar	-
7	CVE2	Estufa	-
8	CAP2	Pomar	-
9	CV2	C.Crescimento <i>in vitro</i>	-
10	VV2	C.Crescimento <i>in vitro</i>	-
11	CVP3	Pomar	-
12	CVE3	Estufa	-
13	CAP3	Pomar	-
14	CV3	C.Crescimento <i>in vitro</i>	-
15	CVE4	Estufa	+
16	CAP4	Pomar	+
17	CV4	C.Crescimento <i>in vitro</i>	+
18	VV3	C.Crescimento <i>in vitro</i>	+
19	CVP4	Pomar	+
20	VV4	C.Crescimento <i>in vitro</i>	+
21	CLRV	Controlo positivo	+
22	Nb	Controlo positivo	+
23	CN	Controlo negativo da PCR	-

Saliente-se no entanto que, 5 das 6 amostras positivas foram detectadas numa das quatro repetições do material avaliado (repetição 4), independentemente da sua proveniência. Ora, esta é uma situação altamente improvável se tivermos em conta que cada repetição foi formada por uma fracção retirada aleatoriamente de uma amostra global, obtida também ela de um conjunto aleatório de plantas, tal como explicado em material e métodos.

De qualquer modo, a confirmarem-se estes resultados, que evidentemente necessitam de uma confirmação e uma análise mais aprofundada, a justificação para que existam amostras positivas em material de origem clonal obtido por micropropagação, poderá ser pelo facto do material vegetal de proveniência para o estabelecimento da cultura *in vitro*

estar infectado com CLRV. Neste caso, importa destacar, que o processo de desinfecção é ineficiente na eliminação de vírus em tecidos vegetais (Canhoto,2010).

Relativamente à presença de amostras positivas e negativas no mesmo tipo de material amostrado, esta poderá ser explicada pela irregular distribuição dos vírus nas plantas lenhosas (Martelli 1999).

Na mesma árvore, diferentes tecidos podem estar infectados e outros não, sendo que CLRV encontra-se sobretudo nos feixes vasculares do floema de tecidos lenhificados (Vourinen et al., 2011).

Ao longo dos últimos anos têm vindo a ser relatados problemas de incompatibilidade no médio e longo prazo (período superior a 10,15 anos) nas enxertias de *J. regia* em porta-enxertos do grupo de noqueiras negras (Mircetich & Rowhani, 1984; Ozturk et al., 2008; Aletà & Rovira, 2014; Ferreti et al., 2007). Estes problemas estão associados à presença de CLRV, difíceis de detectar no género *Juglans*, pois as plantas permanecem assintomáticas nos primeiros anos, surgindo apenas problemas de incompatibilidade, posteriormente com o desenvolvimento da doença da linha negra (Ferreti et al., 2007).

As amostras positivas obtidas no presente trabalho indiciam a presença de CLRV no material vegetal de *Juglans* testado. A detecção precoce de material infectado com o vírus é, deste modo, essencial para a futura selecção de material destinado a trabalhos de limpeza sanitária com o objectivo de propagar material isento deste vírus.

O comércio internacional de plantas, está associado à disseminação de pragas e doenças entre regiões e países diferentes. Um dos métodos de mitigar este problema sanitário, é a regulamentação dos estados com a publicação de legislação que impõe normas sanitárias nas actividades de produção e comércio viveirista. Em Portugal, no caso de *J. regia*, de acordo com o decreto-lei nº 82/2017, de 18 de Julho (Diário da República, 2017) que regula a produção, controlo, certificação e comercialização de fruteiras, o CLRV é um dos organismos nocivos para o qual é necessária amostragem e análise para determinar a sua presença. No entanto, sem a adopção de práticas preventivas de disseminação de pragas e doenças no sector viveirista e sem uma adequada fiscalização, a produção de legislação por si só, não resolve o problema.

Conhecendo o histórico do problema da doença da linha negra causada pelo CLRV nos Estados Unidos e na Europa, com a utilização da combinação de enxertos de *J. regia* em espécies e híbridos do grupo das noqueiras negras, é espectável que ocorra o problema em breve em Portugal. O vírus e a doença já foram referenciados em Espanha (Aletà & Rovira, 2014), aumentando assim a probabilidade da propagação do vírus na Península

Ibérica, tendo como agravante a sua fácil disseminação através de pólen proveniente de plantas infectadas (Jones, 2014).

Assim, o sector viveirista nacional deve adoptar medidas que evitem a disseminação em larga escala da propagação da doença, procurando reduzir a probabilidade de comercializar nogueiras infectadas. A utilização de material de propagação originário de cultura *in vitro*, analisado e certificado como isento de vírus cumprindo a legislação portuguesa, pode apresentar-se como uma garantia, comparativamente às plantas obtidas com métodos tradicionais. Esta medida poderá atenuar nos pomares a propagação do vírus sobretudo nas novas áreas de expansão da cultura. Deste modo, evitar-se-ia a utilização de material infectado proveniente do campo com o vírus, destinado à enxertia de plantas em viveiro ou em local definitivo.

Existe a expectativa de que no futuro, estejam disponíveis no mercado porta-enxertos tolerantes ao vírus, uma vez que é um dos objectivos do programa de melhoramento da Universidade da Califórnia (Leslie et al., 2017). A sua utilização poderá ser uma solução, mas não no curto prazo, pois actualmente estes tipo de porta-enxertos não se encontram disponíveis comercialmente na Europa.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objectivo de avaliar a possibilidade de efectuar a microenxertia da noqueira com sucesso numa fase precoce do processo de propagação foi alcançado. Os ensaios realizados, apresentam-se como uma abordagem pioneira à utilização da técnica da microenxertia com material vegetal do género *Juglans* proveniente de cultura *in vitro* em Portugal. Os resultados obtidos nos ensaios sobre microenxertia permitem concluir que a técnica proposta apresenta boas perspectivas para a produção de noqueiras microenxertadas.

Os principais aspectos a destacar destes ensaios são os seguintes:

- O protocolo de obtenção do porta-enxerto cl. 'Vlach' é bastante satisfatório nas fases de multiplicação, enraizamento e aclimatização. No entanto, para a obtenção de enxerto da cv. 'Chandler', as fases de multiplicação e alongamento ainda não garantem a disponibilidade de material de enxertia de um modo regular.

-Do ponto de vista da execução dos ensaios, verificou-se que um dos aspectos determinantes, é a rapidez de execução das operações de enxertia, de modo a evitar a desidratação das plantas provenientes de condições *in vitro* antes de prosseguirem para condições *ex vitro*.

-O controlo das condições ambientais na aclimatização, nomeadamente a manutenção de temperaturas estáveis entre 27, 28 °C e humidade relativa elevada é essencial para o sucesso da enxertia.

-A utilização desta técnica permite a obtenção de plantas num período inferior a um ano, para a plantação em local definitivo, reduzindo o tempo necessário para obtenção de uma noqueira enxertada. Deste modo, seria dispensável a transferência para viveiros em estufa ou campo aberto, para efectuar a enxertia das plantas com recurso a técnicas convencionais, que se traduzem em longos períodos de tempo cerca de dois a três anos.

-No despiste para a presença de CLRV surgiram amostras de material vegetal de todas as proveniências (campo, estufa e cultura *in vitro*), suspeitas de ser positivas, pelo que, dada a natureza exploratória do presente trabalho justificam uma análise mais detalhada à posteriori.

Algumas das perspectivas e linhas de orientação futuras dos trabalhos de propagação em noqueiras podem resumir-se nos seguintes aspectos:

-Ajustar as condições de crescimento da cv. 'Chandler' relativamente às fases de multiplicação e alongamento de modo a aumentar a disponibilidade de material *in vitro* para enxertia.

-Quantificar os custos de produção por planta microenxertadas e compará-los com os custos do sector viveirista que utiliza as técnicas clássicas.

-Equacionar-se a possibilidade do estabelecimento de cultivares de *J. regia* diferentes da cv. Chandler e porta-enxertos diferentes do cl. 'Vlach'. Apesar do sucesso da combinação cv. 'Chandler /cl.'Vlach', limitar a oferta de mercado apenas a uma combinação de enxerto e porta-enxerto, poderá condicionar determinadas opções na plantação dos pomares de noqueira.

-Efectuar o acompanhamento do comportamento agronómico de noqueiras microenxertadas no campo (parâmetros de crescimento, período de juvenilidade, produtividade e sanidade).

-Repetições da testagem para despistar a existência de CLRV, com uma avaliação mais detalhada, com o aumento da amostragem no material estabelecido *in vitro*, com o objectivo de identificar e seleccionar explantes isentos de vírus, e a partir dessa selecção, garantir a multiplicação de material com qualidade sanitária.

6. BIBLIOGRAFIA

Achim, G. & Botu, I. (2001). Results In Walnut Propagation By Using Different Methods. Acta Horticulturae, 544, 504-510.

Aletà, N. & Rovira, M. (2014). El nogal para fruto en Espana. Vida rural. Dic.2014 :34-37.

Aletà, N. & Abelló, L. (2020). El cultivo del nogal Situacion mundial y posibilidad para la Peninsula Ibérica. IRTA.

Disponível em <http://publicaciones.poscosecha.com/es/home/563-el-cultivo-del-nogal-en-el-mundo.html>. Acesso a 27 de Agosto de 2020

Almeida, C. (2017). Importância económica da noqueira para a produção de noz. Agroforum : Revista da Escola Superior Agrária de Castelo Branco. 25:38, p. 27-33.

Aramburu, J., Ninot, A. & Aletà, N. (1997). Translocation of cherry leaf rool virus (CLRv) in *Juglans regia*. Acta Horticulturae, (442), 393–398.

Bandeira, F., Xavier, A., Otoni, W. & Lani, E. (2007). Ex vitro acclimatization of plants propagated by in vitro grafting of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* clones. Revista Árvore, 31(5), 773-781.

Barbas, E., Jay-Allemand, C., Doumas, P., Chaillou, S. & Cornu, D. (1993). Effects of gelling agents on growth, mineral composition and naphthoquinone content of in vitro explants of hybrid walnut tree (*Juglans regia* × *Juglans nigra*). In Annales des sciences forestières (Vol. 50, No. 2, pp. 177-186). EDP Sciences.

Barut, E. (2001). Different Whip Grafting Methods on Walnut. Acta Horticulturae, 544, 58-72.

Bernard, A., Lheureux, F. & Dirlewanger, E. (2018). Walnut: past and future of genetic improvement. Tree Genetics & Genomes, 14(1), 1.

Buchner, R. P., DeBuse, C. J., Lampinen, B. D., McGranahan, G. H., Leslie, C. A., Hackett, W. & Spanfelner, F. (2010, August). Clonal Walnut Rootstocks in Northern California. In Hortscience (Vol. 45, No. 8, pp. S189-S190). Amer. Soc. Horticultural Science.

Buzo, T., McKenna, J., Kaku, S., Anwar, S. A. & McKenry, M. V. (2009). VX211, a vigorous new walnut hybrid clone with nematode tolerance and a useful resistance mechanism. *Journal of nematology*, 41(3), 211.

Caboni, E. & Damiano, C. (2006). In vitro propagation of walnut (*Juglans regia* L.): critical factors for the induction of the rooting response. *Acta Horti*, 705, 329-333.

Campos, M., Peixe, A., Barroso, J., Rato, A., Ribeiro, A. & Ribeiro, H. (2017, Novembro). The Paradox cl. 'Vlach' multiplication and rooting rates are strongly affected by the explant position on the in vitro growing shoots. Poster apresentado no VIII International Symposium on Walnut, Cashew and Pecan, ISHS. Santiago, Chile.

Canhoto, J. (2010). *Biotechnology Vegetal. Da clonagem de plantas à transformação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra.

Carlos, R. (2014). *Multiplicação in vitro de cultivares e porta-enxertos de noqueira (Juglans regia L.); estudo das fases de enraizamento e climatização*. Dissertação de mestrado em Engenharia Agrónoma. Universidade de Évora.

Catlin, P. (1998). Root Physiology and Rootstock Characteristics. In Ramos, D.E. (ed.). *Walnut production manual*. (Chap. 15, pp.119-126) Publication 3373. University of California, Division of Agricultural and Natural Resources.

Chalupa, V. (1981) Clonal propagation of broad-leaved forest trees in vitro. *Comm Inst Forest Cech* 12:255-271

Cosmulescu, S., Trandafir, I. & Nour, V. (2014). Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Pharmaceutical Biology*, 52(5), 575-580

Cornu, D., & Jay-Allemand, C. (1989). Micropropagation of hybrid walnut trees (*Juglans nigra* x *Juglans regia*) through culture and multiplication of embryos. In *Annales des sciences forestières* (Vol. 46, No. Supplement, pp. 113s-116s). EDP Sciences.

Davies, P. J. (Ed.). (2013). *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Springer Science & Business Media.

Decreto-Lei n.º 82/2017. Diário da República n.º 137/2017, Série I de 2017-07-18 Estabelece o regime jurídico das fruteiras e cria o Registo Nacional de Variedades de Fruteiras. Disponível em <https://dre.pt/application/conteudo/107703391>. Acesso a 10 de Outubro de 2020

Delbos, R., Kerlan, C., Dunez, J., Lansac, M., Dosba, F., & Germain, E. (1983). Vírus infection of walnuts in France. *Acta Horticulturae*, (130), 123–132.

Dehghan, B., Vahdati, K., Hassani, D., & Rezaee, R. (2010). Bench-grafting of Persian walnut as affected by pre-and postgrafting heating and chilling treatments. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(1), 48-52.

Deogratias, J. M., Lutz, A., & Dosba, F. (1985, June). In vitro micrografting of shoot tips from juvenile and adult *Prunus avium* L. and *Prunus persica* (L.) Batsch to produce virus-free plants. In *XIII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases* 193 (pp. 139-146).

Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of ‘Paradox’ walnut rootstock [*Juglans hindsii* x *Juglans regia*, tissue culture]. *HortScience* (USA).

Driver, J. & Suttle, G. (1987). Nursery handling of propagules. In *Cell and tissue culture in forestry* (pp. 320-335). Springer, Dordrecht.

Ebrahimi, A., Vahdati, K. & Fallahi, E. (2007). Improved success of Persian walnut grafting under environmentally controlled conditions. *Int. J. Fruit Sci.* 6 (4), 3–12

EDIA (2019) “Anuário Agrícola de Alqueva” EDIA - Empresa de Desenvolvimento e Infraestruturas do Alqueva, S.A. Disponível em <https://www.edia.pt/wp-content/uploads/2020/02/AnuarioAgricolaAlqueva2019.pdf>. Acesso a 11 de Julho de 2020

Farsi, M., Fatahimoghadam, M. R., Zamani, Z., Hassani, D. & Ahmadi, A. (2016). The histology of minigrafting of Persian walnut trees cv. ‘Chandler’. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 3(2), 167-177.

FAS/USDA (2019). *Tree Nuts: World Markets and Trade*. Foreign Agricultural Service/USDA Office of Global Analysis.

Disponível em

<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usdaesmis/files/tm70mv16z/jm2155639/sq87c996m/TreeNuts.pdf>. Acesso a 31 de Agosto de 2020

Ferretti, L., Corsi, B., Luongo, L., Dal Cortivo, C. & Belisario, A. (2017). A survey of cherry leaf roll virus in intensively managed grafted English (Persian) walnut trees in Italy. *Journal of plant pathology*, 99 (2), 423-427.

Gandev, S. (2007). Budding and grafting of the walnut (*Juglans regia* L.) and their effectiveness in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13(6), 683.

Gandev, S. (2015). State-of-the-art and Problems of Walnut Propagation Methods. *Agroznanje*, 15 (1), 95-109.

Gandev, S. & Arnaudov, V. (2011). Propagation method of epicotyl grafting in walnut (*Juglans regia* L.) under production condition. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(2), 173-17.

Gandev, S. & Dzhuvinov, V. (2006). Performance of hypocotyl grafting of walnut under uncontrolled temperature conditions. *Acta horticulturae*.

Grant, J. & McGranahan, G. (2005) English walnut rootstocks help avoid blackline disease, but produce less than ‘Paradox’ hybrid.

Disponível em <https://ucanr.edu/datastoreFiles/391-51.pdf>. Acesso a 7 de Fevereiro de 2020

Grant, J., Symmes, J. & Baldwin, R. (Revised continuously). UC IPM Pest Management Guidelines: Walnut. UC ANR Publication 3471. Oakland, CA

Disponível em <http://ipm.ucanr.edu/PDF/PMG/pmgwalnut.pdf>. Acesso a 11 de Julho de 2020

Gruselle R, Badia N. & Boxus P. (1987). Walnut micropropagation: first results. *Acta Horticulturae* 212:511-516

Güneş, T. (1999). An investigation on rooting of *Juglans regia* L. hardwood cuttings. *Turkish Journal of Botany*, 23(6), 367-372.

Hasey, J., Kluepfel, D. & Anderson, K. (2014). Crown Gall incidence and severity: seedling walnut rootstock versus clonally propagated rootstock. *Acta Horticulturae*, (1050), 305–308.

Hartmann, H., Kester, D. Davies, F. & Geneve, R. (2014). *Plant propagation: principles and practices*. Plant propagation: principles and practices. (Ed. 8). Prentice Hall.

Heile-Sudholt, C., Huetteman, C., Preece, J., Van Sambeek, J. & Gaffney, G. (1986). In vitro embryonic axis and seedling shoot tip culture of *Juglans nigra* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6(2), 189–197.

Hussain, G., Wani, M., Mir, M., Rather, Z. & Bhat, K. (2014). Micrografting for fruit crop improvement. *African Journal of Biotechnology*, 13(25).

Instituto Nacional de Estatística (2009) - Estatísticas Agrícolas: 2008. Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional de Estatística (2013).- Estatísticas Agrícolas: 2012. Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional de Estatística (2018).- Estatísticas Agrícolas: 2017. Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional de Estatística (2019).- Estatísticas Agrícolas: 2018. Lisboa, Portugal.

Jay-Allemand, C., Capelli, P. & Cornu, D. (1992). Root development of in vitro hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. *Scientia Horticulturae*, 51(3-4), 335–342

Jay-Allemand, C, Doumas, P, Sotta, B, Tranvan, H, Niginiac, E, Sandermann, H. & Bonnet-Masimbert, M. (1995). Juvenility and Physiology of Rhizogenesis in two woody species (*Sequoia sempervirens* and *Juglans regia* × *Juglans nigra*). *Contr. to forest tree physiol. Final W.S. ref. Dourdan-France*. pp. 76, 48

Jones, C. (2014). Plant virus ecology and epidemiology: historical perspectives, recent progress and future prospects. *Annals of applied biology*, 164(3), 320-347.

Kluepfel ,D. ; McClean A., Leslie C., Aradhya M. Luo , M., Ramasamy R., Dvorak J.,...& Westphal A. (2017). Advancements in the Development of Disease Resistant Rootstocks. *Walnut Research Reports Database. Repository of the University of California Division of Agricultural & Natural Resources.*

Disponível em <https://ucanr.edu/repository/fileaccess.cfm?article=173321&p=BVTTEN>
Acesso em 12 de Julho de 2020

Leal, D., Sánchez-Olate, M., Avilés, F., Materan, M., Uribe, M., Hasbún, R., & Rodríguez, R. (2007). Micropropagation of *Juglans regia* L. In *Protocols for Micropropagation of Woody trees and fruits* (pp. 381-390). Springer, Dordrecht.

Leslie, C., McGranahan G. (1992). Micropropagation of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). In: Bajaj Y.P.S. (eds) *High-Tech and Micropropagation II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg.

Leslie, C., Hackett,W.,Bujazha, D., Hirbod, S. & McGranahan, G. (2006). Adventitious rooting and clonal plant production of hybrid walnut (*Juglans*) rootstock selections. *Acta Hortic*, 705, 125-128.

Leslie, C., Brown P., McGranahan,G., Hackett W...& Langley. C. (2017). Walnut improvement program 2017. Walnut Research Reports Database. Repository of the University of California Division of Agricultural & Natural Resources

Disponível em

<https://ucanr.edu/repository/fileaccess.cfm?article=173325&p=TMWROT>. Acesso a 12 de Julho de2020

Liu, X., Walawage, S., Leslie, C., Dandekar, A., Tricoli, D., Hu, H., ... & Zhang, Q. (2017). In vitro gene expression and mRNA translocation from transformed walnut (*Juglans regia*) rootstocks expressing DsRED fluorescent protein to wild-type scions. *Plant cell reports*, 36(6), 877-885.

Lloyd, G., McCown, B., (1981). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. *Proc. Plant Prop. Soc.* 30, 421–427.

Lopez, J. (1999, September). Field behaviour of self-rooted walnut trees of different cultivars produced by tissue culture and planted in Murcia (Spain). In IV International Walnut Symposium 544 (pp. 543-546).

Mapa.gob.es (2020)

Disponível em <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>. Acesso a 11 de Julho de 2020

Martelli, G. (1999). Infectious disease and certification of olive: an overview. *Bulletin OEPP/EPPO*, 29, 127-133.

Martínez-Gómez, P. & Gradziel, T. (2001). In vivo micrografts in almond and their application in breeding programs. *HortTechnology*, 11(2), 313-315.

McGranahan, G., Driver, J. & Tulecke, W. (1987). "Tissue culture of *Juglans*" in Cell and Tissue Culture in Forestry, eds. J. M. Bonga and D. J. Durzan (Martinus Nijhoff, Boston), 3, 261–271.

McGranahan, G., Leslie, C. & Driver, J. (1988). In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. HortScience, 23(1).

Melnyk, C. & Meyerowitz, E. (2015). Plant grafting. Current Biology 25: R183–R188

Millán C., Pablo A., Belén F., Ana R. & Maria C. (2004). Micrografting of mature stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. Annals of Forest Science, Springer Verlag/EDP Sciences, 61 (8), pp.843-845.

Mircetich, S., Sanborn, R., & Ramos, D. (1980). Natural spread, graft-transmission and possible etiology of walnut blackline disease. Phytopathology, 70(10), p962-968.

Mircetich, S., & Rowhani, A. (1984). The relationship of cherry leafroll virus and blackline disease of English walnut trees. Phytopathology, 74 (4), 423-428.

Moreno, R., Morales, A., Gradaille, M., & Gómez, L. (2012). Towards scaling-up the micropropagation of *Juglans major* (Torrey) Heller var. 209 x *J. regia* L., a hybrid walnut of commercial interest. Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management. IUFRO, Czech Republic, 80-9.

Murashige, T. & Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473–497.

Murashige, T., Bitters, W. Rangan, T., Nauer, E., Roistacher, C. & Holliday, P. (1972). A Technique of Shoot Apex Grafting and its Utilization towards Recovering Virus-free Citrus Clones. HortScience 7(2):118-119.

Navarro, L. Roistacher, C. & Murashige, T. (1975). Improvement of Shoot-tip Grafting in Vitro for Production of Virus-free Citrus. J. Am. Soc. Hort. Sci., 100 (5):471-479.

Navarro, L. & Juarez, J. (1977). Tissue culture techniques used in Spain to recover virus-free citrus plants. *Acta Hort.* 78:425-435.

Navarro, L. (1988). Application of shoot-tip grafting in vitro to Woody species. *Acta Hort.* 227, 43-56.

Nass.usda.gov (2020). 2017 California Walnut Acreage Report. United States Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service

Disponível em

https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/California/Publications/Specialty_and_Other_Releases/Walnut/Acreage/2018walac.pdf Acesso a 11 de Julho de 2020

Nutfruit.org.(2020).

Disponível em

https://www.nutfruit.org/files/tech/1553521370_INC_Statistical_Yearbook_2018.pdf
Acesso a 11 de Julho de 2020.

Obeidy, A. & Smith, M. (1991). A versatile new tactic for fruit tree micrografting. *HortScience*, 26(6), 776D-776.

Ozturk, M. , Sipahioglu, H., Ocak, M. & Usta, M. (2008). Cherry leafroll virus in *Juglans regia* in the Lake van Basin of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 75-79.

Pahnekolayi, M., Tehranifar, A., Samiei, L. & Shoor, M. (2019). Optimizing culture medium ingredients and micrografting devices can promote in vitro micrografting of cut roses on different rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(2), 265-274.

Pantaleo, V., Saponari, M., & Gallitelli, D. (2001). Development of a nested PCR protocol for detection of olive-infecting viruses in crude extracts. *Journal of Plant Pathology*, 143-146.

Payghamzadeh, K., & Kazemitabar, S. (2011). In vitro propagation of walnut-A review. *African Journal of Biotechnology*, *10*(3), 290-311.

Peixe, A., Alpendre, P., Barroso, J., Carlos, R., & Soto, M. (2015). New strategies for *in vitro* rooting and plantlet acclimatization of the "Paradox" (*Juglans regia* × *Juglans hindsii*) rootstock. *Acta Horticulturae*, (1083), 287–293.

Pei, D., Lichai, Y., Qingming, W. & Ruisheng, G. (2007). Factors affecting rooting of in vitro shoots of walnut cultivars. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, *82*(2). 223-226

Pollegioni, P., Woeste, K., Chiocchini, F., Del Lungo, S., Olimpieri, I. & Tortolano, V. (2015). Ancient Humans Influenced the Current Spatial Genetic Structure of Common Walnut Populations in Asia. *PLoS ONE* *10*(9), e0135980.

Pospóšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. & Plzáková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*, *42*(4), 481-497.

Porfírio, S., da Silva, M., Cabrita, M., Azadi, P. & Peixe, A. (2016). Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*, *198*, 207-226.

Pou, M. (2012). *El nogal: técnicas de producción de fruto y madera*. Madrid Ediciones Mundi Prensa.

Preece, J., & McGranahan, G. (2015). Luther Burbank's contributions to walnuts. *HortScience*, *50*(2), 201-204.

Ramos, A. & Valério, F. (2017). A importância dos hábitos de frutificação da noqueira na implantação do pomar. *Agroforum: Revista da Escola Superior Agrária de Castelo Branco*, *25* (38), 7-16.

Rehman, H., & Gill, M. (2015). Micrografting of Fruit Crops-A Review. *Journal of Horticulture*, 1-7.

Reil, W., Leslie, C., Forde, H. & Mckenna, J. (1998). Propagation. In Ramos, D.E. (ed.). Walnut production manual. (Chap. 9, pp.71-83) Publication 3373. University of California, Division of Agricultural and Natural Resources.

Ripetti, V., Kevers, C. & Gaspar, T. (1994). Two successive media for the rooting of walnut shoots in vitro. Changes in peroxidase activity and in ethylene production. *Advances in Horticultural Science*, 29-32.

Rongting, X. & Pinghai, D. (1993). A study on the uniting progress of walnut grafting and the factors affecting. *Acta Horticulturae*, (311), 160–171.

Saadat, Y. & Hennerty, M. (2002). Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae*, 95(3), 251-260.

Sadeghi, R., Vahdati, K., Roozban, R., & Arab, M. (2018). Exploring Combinations of Graft Cover and Grafting Method in Commercial Walnut Cultivars. *International Journal of Fruit Science*, 1-13.

Scaltsoyiannes, A., Tsoulpha, P., Panetsos, K. & Moulalis, D. (1998). Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). *Silvae Genetica*, 46, 326-331.

Schuster C. & Miller P. (1933). A disorder of Persian (English) walnuts grafted on black-walnut stocks, resulting in girdling. *Phytopathology* 23: 408-409.

Sharma, A. & Zheng, B. (2019). Molecular Responses during Plant Grafting and Its Regulation by Auxins, Cytokinins, and Gibberellins. *Biomolecules*, 9(9), 397.

sir.dgadr.gov.pt (2005) Identificação das potencialidades do regadio de Alqueva
Disponível em http://sir.dgadr.gov.pt/images/conteudos/gpaa/tomos/tomo_3.pdf
Acesso a 11 de Julho de 2020

Solar, A., Stampar, F., Trost, M., Barbo, J. & Avsec, S. (2001). Comparison of different propagation methods in walnut (*Juglans regia* L.) made in Slovenia. *Acta Horticulturae*, 544, 527-530.

Suk-In, H., Moon-Ho, L., & Yong-Seok, J. (2006). Study on new vegetative propagation method 'Epicotyl Grafting' in walnut trees (*Juglans* Spp.). *Acta horticulturae*.

Suo, Z., Pei, D., Ma, Q. & Jin, X. (2012). Genetic formation of 'Paradox' hybrids (*Juglans* L.) revealed by nrDNA IGS8-ETS1 region. *AASRI Procedia*, 1, 156-165.

Sutter, G., & Mckenna, R. (1995). Clonal Propagation and Nursery Production of Hybrid Walnut Rootstocks. *Walnut Research*, 53-67.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. 5th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

Tulecke, W. & McGranahan, G. (1994). The Walnut Germplasm Collection of the University of California, Davis: A Description of the Collection and a History of the Breeding Program of Eugene F. Serr and Harold I. Forde. Genetic Resources Conservation Program. Division of Agriculture and Natural Resources, University of California.

Vahdati, K., Leslie, C., Zamani, Z. & McGranahan, G. (2004). Rooting and acclimatization of *in vitro*-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars. *HortScience*, 39(2), 324-327.

Vahdati, K., Razaee, R., & Mirmasoomi, M. (2009). Micropropagation of some dwarf and early mature walnut genotypes. *Biotechnology*, 8(1), 171-175.

Vahdati, K. & Zareie, N. (2006). Evaluation of side-stub and hypocotyl grafting efficiency for walnut propagation in Iran. *Acta Hortic.* 705, 347–350

Vahdati, K. & Aliniaiefard, S. (2017). Investigation of physiological components involved in low water conservation capacity of *in vitro* walnut plants. *Scientia Horticulturae*, 224, 1-7.

Vahdati K., Arab M., Sarikhani S., Sadat-Hosseini M., Leslie C. & Brown P. (2019). Advances in Persian Walnut (*Juglans regia* L.) Breeding Strategies. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (eds) Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops. Springer, Cham.

Van Zyl, L. (2008). Grafting of walnut (*Juglans regia* L.) with hot callusing techniques under South African conditions (Doctoral dissertation, University of the Free State).

Vuorinen, A., Kelloniemi, J. & Valkonen, J. (2011). Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants?. *Plant science*, 181(4), 355-363.

Wulf, K., Reid, J. & Foo, E. (2019). Auxin transport and stem vascular reconnection—has our thinking become canalized ? *Annals of botany*, 123(3), 429-439.

Yıldırım, H., Akdemir, H., Süzerer, V., Ozden, Y. & Onay, A. (2013). In vitro micrografting of the almond cultivars ‘Texas’, ‘Ferrastar’ and ‘Nonpareil’. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(1), 3493-3501.