

MSC

2.º
CICLO

FCUP
2017

U.PORTO

Propagação *in vitro* dos porta-enxertos GF677 e
Vlach

Joana Martins Lopes

FC



Propagação *in vitro* dos porta-enxertos GF677 e Vlach

Joana Martins Lopes

Relatório de estágio apresentado à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Mestrado em Biologia Funcional e Biotecnologia de Plantas
2017



Propagação *in vitro* dos porta-enxertos GF677 e Vlach

Joana Martins Lopes

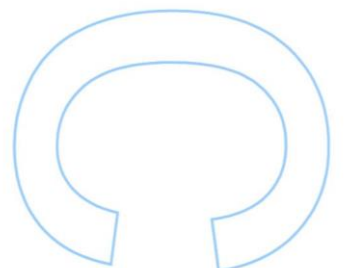
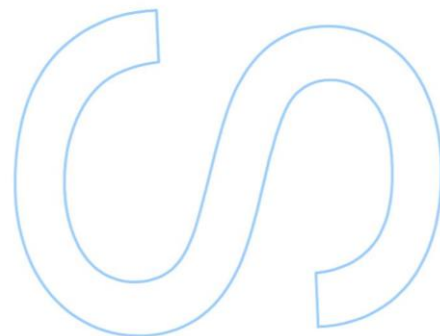
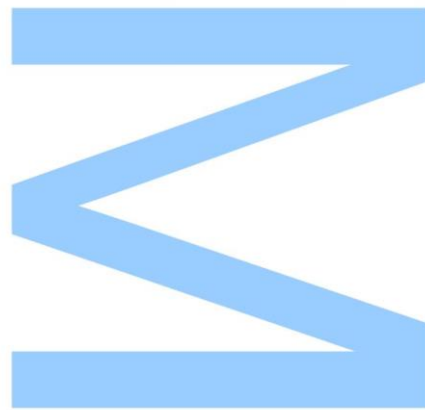
Mestrado em Biologia Funcional e Biotecnologia de Plantas
Departamento de Biologia
2017

Orientador FCUP

Paula Melo, Diretora do Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Orientador Deifil

Andreia Afonso, CEO, DEIFIL Technology LDA

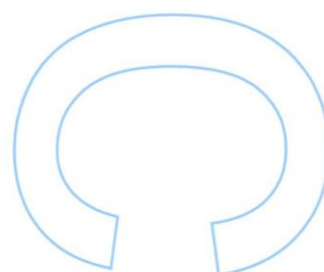
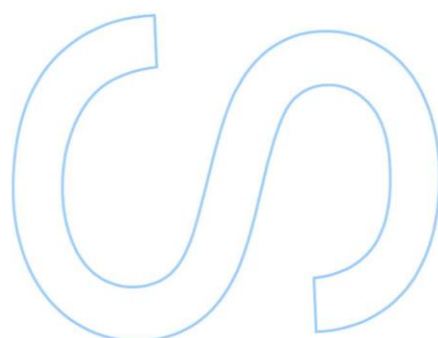
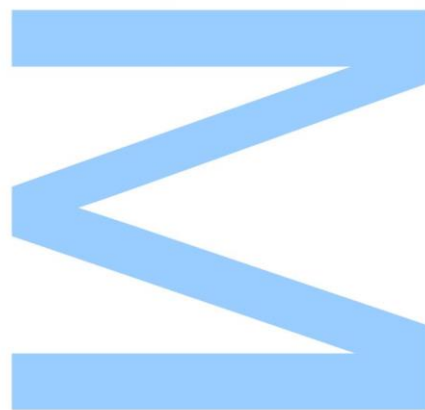




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Durante a realização deste estágio contei com a orientação, incentivo e apoio de várias pessoas, às quais gostava de deixar o meu sincero agradecimento:

À Professora Doutora Paula Melo, Diretora do mestrado em Biologia Funcional e Biotecnologia de Plantas da FCUP, pela sua excelente orientação, enorme disponibilidade e por todo o encorajamento dado ao longo deste ano de trabalho.

À Mestre Andreia Afonso, CEO da Deifil, pela sua ótima orientação, grande disponibilidade, compreensão e pelas horas de trabalho, discussão e conversa que me ajudaram a ultrapassar todos os obstáculos.

Aos restantes colaboradores e estagiários da Deifil, por todo o apoio e colaboração.

Por último, queria deixar um especial agradecimento à minha família pelo incentivo, apoio, preocupação e paciência demonstrados.

Obrigado a todos!

Abstract

Nuts have a high economic importance in Portugal and worldwide. In some regions of our country, nuts represent the main source of income of the rural populations. With the increasing demand for nuts, the portuguese farmers are investing more and more in this kind of crops, mainly almond and walnut.

The modern agriculture requires the adoption of new highly profitable production methods, such as the intensive and superintensive farming. In these kinds of farming, a high number of plants are needed, witch represents a high initial investment for the farmers.

In vitro propagation of rootstocks of almond and walnut is the best method to produce a larger number of plants with genetic and phytossanitary quality. Although these rootstocks are already reproduced *in vitro*, it is necessary to improve the *in vitro* culture techniques to reduce the production costs and obtain a large number of plants.

The aim of this internship was the development of efficient and profitable *in vitro* production protocols of the GF677 (*Prunus dulcis* x *Prunus persica*) and Vlach (*Juglans regia* x *Juglans hindssi*) rootstocks, in agreement with the published literature and Deifil's conditions and resources. With this purpose, it was performed the induction of epicormics shoots, the optimization of the pretreatment of the mother plants, the optimization of the desinfection method of the explants, *in vitro* culture establishments in different seasons of the year, *in vitro* propagation of these rootstocks through different clonal regeneration pathways and the improvement of the culture medium or substrate in the different phases of the propagation process. Additionally, it was compared different clones of GF677 rootstock in order to detect differences between genotypes and select the best clones for *in vitro* mass propagation.

The goal defined for GF677 was reached, that is, all phases of the *in vitro* propagation process were optimized. The work performed resulted in the production of 9429 plants of GF677. In the case of Vlach, the *in vitro* propagation process was optimized only until the establishment phase.

This internship allowed me the acquisition of new practical and theoretical knowledge of plant biotechnology and the development of professional skills in real work context. Additionally, this work contributed to the development of efficient and profitable *in vitro* production protocols of these two rootstocks in Deifil's company.

Keywords: *In vitro* propagation, almond, walnut, rootstocks, GF677, Vlach.

Resumo

Os frutos secos apresentam uma grande importância económica, tanto em Portugal como a nível mundial, representando em algumas regiões do nosso país a principal fonte de rendimento das populações rurais. Devido à crescente procura mundial por frutos secos, os agricultores portugueses têm vindo a investir cada vez mais no seu cultivo, principalmente, da amêndoa e da noz.

A agricultura moderna exige a adoção de novos modos de produção altamente rentáveis como o modo de produção intensivo e super-intensivo. Contudo, estes modos de produção implicam, entre outros requisitos, a aquisição de um elevado número de plantas, contribuindo para um grande investimento inicial dos agricultores.

A propagação *in vitro* de porta-enxertos da amendoeira e nogueira demonstrou ser o melhor método para a obtenção de um maior número de plantas com a garantia de qualidade genética e fitossanitária. Apesar destes porta-enxertos serem já reproduzidos *in vitro*, existem ainda várias limitações como os elevados custos de produção e a dificuldade em obter um elevado número de plantas.

O principal objetivo deste estágio foi o desenvolvimento de protocolos de produção *in vitro* dos porta-enxertos GF677 (*Prunus dulcis* x *Prunus persica*) e Vlach (*Juglans regia* x *Juglans hindssi*) eficazes e rentáveis, tendo em consideração a literatura publicada e as condições e recursos existentes na Deifil. Nesse sentido, foi feita a indução da formação de rebentos epicórmicos, a otimização do pré-tratamento das plantas-mãe, a otimização do método de desinfecção dos explantes, a realização de estabelecimentos *in vitro* em diferentes épocas do ano, a propagação *in vitro* mediante diferentes vias de regeneração clonal e ainda, a otimização do meio de cultura ou substrato ao longo das diferentes fases do processo de propagação. Foi ainda efetuada a comparação de diferentes clones do porta-enxertos GF677 de modo a detetar diferenças entre os genótipos e desta forma selecionar os melhores clones para a propagação *in vitro* em grande escala.

O objetivo definido para GF677 foi alcançado, isto é, foram otimizadas todas as fases do processo de propagação *in vitro*. Do trabalho efetuado durante este estágio resultaram 9429 plântulas de GF677. No caso de Vlach, apenas se otimizou o processo de propagação *in vitro* até à fase de estabelecimento.

Este estágio permitiu-me adquirir novos conhecimentos teóricos e práticos na área da biotecnologia vegetal e desenvolver competências técnicas e profissionais em contexto real de trabalho. Para a Deifil, o trabalho desenvolvido contribuiu para o desenvolvimento de protocolos de produção *in vitro* eficientes e rentáveis para estes dois porta-enxertos.

Palavras-Chave: Propagação *in vitro*, amendoeira, nogueira, porta-enxertos, GF677, Vlach.

Índice

Agradecimentos	I
Abstract	II
Resumo	III
Lista de Figuras	VIII
Lista de Gráficos	X
Lista de Quadros	XI
Lista de abreviaturas.....	XII
Deifil	XIII
Capítulo 1 – Introdução	14
1.1. A amendoeira.....	14
1.1.1. Centro de origem, características gerais e classificação taxonómica	14
1.1.2. Distribuição geográfica e importância económica	15
1.1.3. Exigências edafoclimáticas e principais pragas e doenças	16
1.1.4. Cultura do amendoal.....	17
1.2. A noqueira	18
1.2.1. Centro de origem, características gerais e classificação taxonómica	18
1.2.2. Distribuição geográfica e importância económica	20
1.2.3. Exigências edafoclimáticas e principais pragas e doenças	21
1.2.4. Cultura do nogal.....	23
1.3. Os porta-enxertos	24
1.3.1. Porta-enxertos da amendoeira	26
1.3.1.1. O porta-enxertos GF677	27
1.3.2. Porta-enxertos da noqueira.....	27
1.3.2.1. Os híbridos Paradox	29
1.4. A cultura <i>in vitro</i>	30
1.4.1. Métodos de regeneração clonal <i>in vitro</i>	32
1.4.2. Principais dificuldades da cultura <i>in vitro</i>	33
1.4.3. Fatores que condicionam o sucesso da cultura <i>in vitro</i>	34
1.4.3.1. Genótipo da planta.....	34
1.4.3.2. Tipo de explante.....	35
1.4.3.3. Estação do ano	36

1.4.3.4. Composição do meio de cultura	36
1.4.3.4.1. Macro e micronutrientes.....	37
1.4.3.4.2. Hidratos de carbono	38
1.4.3.4.3. Vitaminas	38
1.4.3.4.4. Aminoácidos e amidas	38
1.4.3.4.5. Reguladores de crescimento.....	39
1.4.3.4.5.1. Auxinas	39
1.4.3.4.5.2. Citocininas	40
1.4.3.4.6. Agentes gelificantes	42
1.4.3.5. Condições ambientais	43
1.4.3.5.1. Humidade.....	43
1.4.3.5.2. Luz.....	43
1.4.3.5.3. Temperatura	45
1.4.4. Fases da cultura <i>in vitro</i>	46
1.4.4.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	46
1.4.4.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	47
1.4.4.3. Enraizamento <i>in vitro/ex vitro</i>	48
1.4.4.4. Aclimatização <i>ex vitro</i>	49
1.5. Propagação <i>in vitro</i> dos porta-enxertos GF677 e Vlach	49
1.5.1. Propagação <i>in vitro</i> de GF677	49
1.5.2. Propagação <i>in vitro</i> de Vlach	53
1.6. Objetivos do estágio.....	57
Capítulo 2 - Material e Métodos	59
2.1. Material vegetal.....	59
2.1.1. Seleção e pré-tratamento das plantas-mãe.....	59
2.1.2. Recolha de material vegetal.....	59
2.1.2.1. Indução da formação de rebentos epicórmicos	60
2.2. Propagação <i>in vitro</i> das culturas	61
2.2.1. Materiais e procedimentos relativos ao processo de propagação <i>in vitro</i>	61
2.2.2. Estabelecimento <i>in vitro</i>	61
2.2.2.1. Desinfecção do material vegetal	61
2.2.2.2. Indução da rebentação axilar	62

2.2.2.3. Indução da organogênese indireta	65
2.2.3. Multiplicação <i>in vitro</i>	66
2.2.4. Enraizamento <i>in vitro</i>	69
2.2.5. Aclimatização <i>ex vitro</i>	71
2.3. Análise estatística dos resultados	72
Capítulo 3 - Resultados e Discussão.....	73
3.1. Propagação <i>in vitro</i> do porta-enxertos GF677	73
3.1.1. Indução da formação de rebentos epicórmicos	73
3.1.2. Estabelecimento <i>in vitro</i>	74
3.1.2.1. Pré-tratamento das plantas-mãe e desinfecção do material vegetal	74
3.1.2.2. Indução da rebentação axilar	77
3.1.2.3. Indução da organogênese indireta	80
3.1.3. Multiplicação <i>in vitro</i>	82
3.1.4. Enraizamento <i>in vitro</i>	90
3.1.5. Aclimatização <i>ex vitro</i>	100
3.2. Propagação <i>in vitro</i> do porta-enxertos Vlach	105
3.2.1. Indução da formação de rebentos epicórmicos	105
3.2.2. Estabelecimento <i>in vitro</i>	106
3.2.2.1. Pré-tratamento das plantas-mãe e desinfecção do material vegetal	106
3.2.2.2. Indução da rebentação axilar	108
3.2.2.3. Indução da organogênese indireta	113
3.2.3. Multiplicação <i>in vitro</i>	114
Capítulo 4 - Outras atividades.....	115
Capítulo 5 - Conclusão	116
Capítulo 6 - Referências Bibliográficas	120
Capítulo 7 - Anexos	134
Anexo 1 - Plantas-mãe	134
Anexo 2 - Indução da formação de rebentos epicórmicos em GF677 e Vlach	136
Anexo 3 - Meio MS (meio basal)	138
Anexo 3 - Meio MS (vitaminas)	139
Anexo 4 - Meio WPM (meio basal)	140
Anexo 4 - Meio WPM (vitaminas presentes na formulação WPP04)	141

Anexo 5 - Meio DKW (meio basal)	142
Anexo 5 - Meio DKW (vitaminas presentes na formulação DKP02)	143
Anexo 6 - Meio MS _{1/2} nitratos (meio basal)	144

Lista de Figuras

Fig.1 - Logótipo da Deifil	XIII
Fig.2 - <i>Prunus dulcis</i> (Jardim Botânico da UTAD, 2016a).	15
Fig.3 - <i>Juglans regia</i> (Jardim Botânico da UTAD, 2016b; Iannamico, 2009).....	20
Fig.4 - A fotossíntese (Philips Horticulture LED Solutions, 2015).	36
Fig.5 - Efeito da razão entre a concentração de auxina e citocinina no meio de cultura nas respostas morfogénicas obtidas <i>in vitro</i> (Adaptado de Slater <i>et al.</i> , 2008).....	42
Fig.6 - Eficiência relativa da fotossíntese em função do comprimento de onda da radiação absorvida (Philips Horticulture LED Solutions, 2015).....	44
Fig.7 - Comparação da distribuição da intensidade luminosa entre as lâmpadas fluorescentes e as lâmpadas LED (Philips Horticulture LED Solutions, 2015).....	45
Fig.8 - Indução da formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos dos clones I, II, III e IV de GF677.....	73
Fig.9 - Rebentos epicórmicos formados exclusivamente nos ramos adultos do clone IV de GF677, após sete dias de indução.....	74
Fig.10 - Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmento nodal de GF677 no meio de cultura M1.	78
Fig.11 - Rebento axilar formado em segmento nodal de GF677 no meio de cultura M1, após três semanas de cultura.	80
Fig.12 - Estabelecimento <i>in vitro</i> de fragmento foliar de GF677 no meio de cultura M2C0,5IA.....	81
Fig.13 - Formação residual de <i>calli</i> em fragmentos foliares de GF677 no meio de cultura M2C0,5IA, após quatro semanas de cultura.....	81
Fig.14 - Multiplicação <i>in vitro</i> de GF677 no meio de cultura M3, após quatro semanas de cultura.....	83
Fig.15 - Multiplicação <i>in vitro</i> de GF677 no meio de cultura M5, após quatro semanas de cultura.....	83
Fig.16 - Multiplicação <i>in vitro</i> de GF677 nos meios de cultura M9 e M13, respetivamente, após quatro semanas de cultura.....	84
Fig.17 - Multiplicação <i>in vitro</i> de GF677 nos meios de cultura M5 e M10, respetivamente, após quatro semanas de cultura.....	85
Fig.18 - Multiplicação <i>in vitro</i> de GF677 no meio de cultura M14, após quatro semanas de cultura.....	85

Fig.19 - Multiplicação <i>in vitro</i> de GF677 no meio de cultura M8, após quatro semanas de cultura.....	86
Fig.20 - Multiplicação <i>in vitro</i> de GF677 nos meios de cultura M2 e M4, respetivamente, após quatro semanas de cultura.....	87
Fig.21 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M1, após quatro semanas de cultura.....	95
Fig.22 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M2, após quatro semanas de cultura.....	95
Fig.23 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M3, após quatro semanas de cultura.....	96
Fig.24 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M4, após quatro semanas de cultura.....	96
Fig.25 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M5, após quatro semanas de cultura.....	97
Fig.26 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M6, após quatro semanas de cultura.....	97
Fig.27 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M7, após quatro semanas de cultura.....	98
Fig.28 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M8, após quatro semanas de cultura.....	98
Fig.29 - Lavagem das plântulas do clone II de GF677 antes da aclimatização <i>ex vitro</i>	100
Fig.30 - Aclimatização <i>ex vitro</i> na estufa das plântulas do clone II de GF677 num tabuleiro alveolar com o substrato VECO3 e em caixas com uma mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1 (v/v), respetivamente (Dia 0).....	101
Fig.31 - Plântulas do clone II de GF677 com raíz, após 0 e 4 semanas (28 dias) de aclimatização <i>ex vitro</i> na estufa.	103
Fig.32 - Plântulas do clone II de GF677 sem raíz, após 0 e 4 semanas (28 dias) de aclimatização <i>ex vitro</i> na estufa.	103
Fig.33 - Rebentos epicórmicos formados nos ramos adultos de Vlach no teste com a aplicação de BAP na concentração de 2 mg/l, após quatro semanas de indução.	105
Fig.34 - Rebentos epicórmicos formados nos ramos adultos de Vlach no teste sem a aplicação de BAP, após quatro semanas de indução.	105
Fig.35 - Estabelecimento <i>in vitro</i> de gomo axilar de Vlach no meio de cultura M1. ...	109
Fig.36 - Rebento obtido de gomo axilar de Vlach no meio de cultura M1, após cinco semanas de cultura.....	110
Fig.37 - Estabelecimento <i>in vitro</i> de rebento epicórmico de Vlach no meio de cultura M2.	110
Fig.38 - Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmento nodal de Vlach no meio de cultura M5.	111

Fig.39 - Rebentos axilares formados em segmentos nodais de Vlach nos meios de cultura M4, M5 e M6, respetivamente, após quatro semanas de cultura.....	112
Fig.40 - Estabelecimento <i>in vitro</i> de fragmento foliar de Vlach no meio de cultura D2C0,5I.	113
Fig.41 - Fragmento foliar de Vlach no meio de cultura D2C0,5IA, após quatro semanas de cultura.....	113
Fig.42 - Plantas-mãe de GF677.....	134
Fig.43 - Plantas-mãe de Vlach.....	135
Fig.44 – Pré-tratamento antifúngico com Switch® dos ramos adultos de GF677 e Vlach.....	136
Fig.45 - Secagem do material vegetal ao ar livre. Na figura é apresentado material vegetal de GF677 (à esquerda) e de Vlach (à direita).....	136
Fig.46 - Material vegetal acondicionado num saco plástico devidamente identificado, e de seguida, sujeito a um tratamento pelo frio.....	136
Fig.47 - Material vegetal de GF677, após 43 dias de tratamento pelo frio. Na figura são apresentados os clones I, II, III e IV de GF677 (da esquerda para a direita).	137
Fig.48 - Material vegetal do clone 0 de Vlach, após 99 (à esquerda) e 90 (à direita) dias de tratamento pelo frio.....	137
Fig.49 - Indução da formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos de GF677 e Vlach.....	137

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Avaliação do efeito do pré-tratamento fitossanitário das plantas-mãe na taxa de contaminação dos explantes de GF677 na fase de estabelecimento <i>in vitro</i> . .	74
Gráfico 2 - Avaliação do efeito do tempo de contacto com a lixívia na taxa de contaminação dos explantes de GF677 na fase de estabelecimento <i>in vitro</i>	76
Gráfico 3 - Avaliação do efeito do meio de cultura M1 na fase de estabelecimento <i>in vitro</i> de GF677, após uma e três semanas de cultura.	79
Gráfico 4 - Avaliação do efeito dos meios de cultura M1, M2, M3 e M4 na fase de estabelecimento <i>in vitro</i> do clone V de GF677, após uma e três semanas de cultura. .	79
Gráfico 5 - Avaliação do efeito do meio de cultura na fase de multiplicação <i>in vitro</i> de GF677.....	82
Gráfico 6 - Avaliação do efeito da redução da concentração de mio-inositol no meio de cultura MS na fase de multiplicação <i>in vitro</i> de GF677.....	86
Gráfico 7 - Avaliação do efeito da concentração do agente gelificante no meio de cultura na fase de multiplicação <i>in vitro</i> de GF677.....	88
Gráfico 8 - Avaliação da influência do genótipo da planta na fase de multiplicação <i>in vitro</i> de GF677.....	90

Gráfico 9 - Avaliação do efeito do meio de cultura na fase de enraizamento <i>in vitro</i> do clone II de GF677.	92
Gráfico 10 - Avaliação do efeito da presença/ausência de raiz nas plântulas na fase de aclimatização <i>ex vitro</i> do clone II de GF677.....	102
Gráfico 11 - Avaliação do efeito do substrato na fase de aclimatização <i>ex vitro</i> do clone II de GF677.....	104
Gráfico 12 - Avaliação do efeito dos meios de cultura M4, M5 e M6 na fase de estabelecimento <i>in vitro</i> de Vlach, após uma e quatro semanas de cultura.....	111

Lista de Quadros

Quadro 1 - Classificação taxonómica da amendoeira (Jardim Botânico da UTAD, 2016a; Parque de Serralves, 2016b).	14
Quadro 2 - Classificação taxonómica da noqueira (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Jardim Botânico da UTAD, 2016b; Parque de Serralves, 2016a).	19
Quadro 3 - Comparação entre porta-enxertos de noqueira relativamente a fatores edafoclimáticos, pragas e doenças (Adaptado de Iannamico, 2009; Hasey <i>et al.</i> , 2015).	29
Quadro 4 - Principais auxinas usadas na cultura <i>in vitro</i> (Adaptado de Slater <i>et al.</i> , 2008).	40
Quadro 5 - Principais citocininas usadas na cultura <i>in vitro</i> (Adaptado de Slater <i>et al.</i> , 2008).	41
Quadro 6 - Meios de cultura testados na fase de estabelecimento <i>in vitro</i> de GF677.	63
Quadro 7 - Meios de cultura testados na fase de estabelecimento <i>in vitro</i> de Vlach.	64
Quadro 8 - Meios de cultura testados na fase de multiplicação <i>in vitro</i> de GF677.....	67
Quadro 9 - Meios de cultura testados na fase de enraizamento <i>in vitro</i> de GF677.....	70
Quadro 10 - Avaliação do efeito do meio de cultura e da concentração de IBA no número de raízes por plântula na fase de enraizamento <i>in vitro</i> de GF677.....	99

Lista de abreviaturas

2,4-D - ácido 2,4-diclofenoxiacético

ApMV – vírus do mosaico da macieira (do inglês *Apple Mosaic Virus*)

B5 - meio de Gamborg

BAP - 6-benzilaminopurina

CLSV – vírus da mancha foliar clorótica (do inglês *Chlorotic Leaf Spot Virus*)

CLVR – vírus do enrolamento foliar da cerejeira (do inglês *Cherry leaf roll vírus*)

CO₂ – dióxido de carbono

CPPU - N-(2-cloro-4-piridil)-N'-fenilureia

DKW – meio de Driver e Kuniyuki

Fe-EDDHA - forma quelatada de Fe-EDTA

GNH- meio de Garoosi, Nezami e Haddad

IAA - ácido 3-indolil-acético

IBA – ácido indolil-3-butírico

LS – meio de Linsmaier e Skoog

MES – tampão MES (ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico)

MS – meio de Murashige e Skoog

NAA – ácido 1-naftalenoacético

PDV – vírus do nanismo de *Prunus* (do inglês *Prunus Dwarf Virus*)

SH – meio de Schenk e Hildebrandt

TK – meio de Tabachnik e Kester

WPM - meio de Lloyd e McCown

Z - zeatina

Deifil

Este relatório resultou do trabalho efetuado durante 9 meses numa empresa privada de Biotecnologia de plantas (DEIFIL Technology Lda), no âmbito da Unidade Curricular “Estágio” do Mestrado em Biologia Funcional e Biotecnologia de Plantas da FCUP.

A Deifil (<http://www.deifil.pt/>), fundada em dezembro de 2010 na Póvoa de Lanhoso, é uma empresa que se dedica à propagação *in vitro* de plantas cujos sistemas de reprodução sexual não são eficientes ou suficientes para dar resposta à demanda do mercado. Constituída por um laboratório de propagação *in vitro* e por uma estufa de aclimatização, a Deifil possui atualmente uma capacidade produtiva de meio milhão de plântulas por ano. Os seus principais clientes correspondem a empresas com atividade viveirista.

A Deifil utiliza a biotecnologia vegetal e as suas técnicas de forma pioneira em Portugal. Em colaboração com diversas instituições, esta empresa aposta na investigação e no desenvolvimento tecnológico para a obtenção de novos produtos e otimização dos processos de propagação, de modo a dar resposta às crescentes exigências do mercado.

O mérito desta empresa foi já reconhecido publicamente várias vezes. Em 2011, foi atribuído o prémio “Jovens Empreendedores” aos seus promotores, Andreia Afonso e Manuel Vieira, no concurso SPINUM e em 2012, a Deifil foi novamente reconhecida na 9ª edição do concurso Poliemprende do Instituto Politécnico de Bragança com o primeiro prémio regional e o segundo prémio a nível nacional.



Fig.1 - Logótipo da Deifil

Capítulo 1 – Introdução

1.1. A amendoeira

1.1.1. Centro de origem, características gerais e classificação taxonómica

A amendoeira, *Prunus dulcis* (Figura 2), é uma espécie nativa dos Balcãs, sudoeste da Ásia e norte de África (Monteiro *et al.*, 2003; Jardim Botânico da UTAD, 2016a; Parque de Serralves, 2016b). Trata-se de uma pequena árvore caducifólia com cerca de 8 a 10 m de altura. O seu fruto, a amêndoa, consiste numa drupa com cerca de 30 a 50 mm de espessura (Grasselly e Duval, 1997; Monteiro *et al.*, 2003; Pereira, 2009; Parque de Serralves, 2016b).

A amendoeira é uma espécie diplóide ($2n=16$) (Genome Database for Rosaceae, 2016), do tipo monóica e de reprodução autogâmica (Ramos das Neves, 1997; Parque de Serralves, 2016b). Em média, vive cerca de 50 anos, contudo, existem exemplares centenários (Pereira, 2009). A classificação taxonómica da amendoeira é apresentada no quadro seguinte.

Quadro 1 - Classificação taxonómica da amendoeira (Jardim Botânico da UTAD, 2016a; Parque de Serralves, 2016b).

Reino	<i>Plantae</i>
Super-divisão	<i>Spermatophyta</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Sub-divisão	<i>Magnoliophytina (Angiospermae)</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sub-classe	<i>Rosidae</i>
Ordem	<i>Rosales</i>
Família	<i>Rosaceae</i>
Sub-família	<i>Prunoideae</i>
Género	<i>Prunus</i>
Espécie (sinónimas)	<i>Prunus dulcis</i> , <i>Prunus amygdalus</i> e <i>Prunus communis</i>
Nome comum	amendoeira, amendoeira-doce (var. <i>dulcis</i>), amendoeira-amarga (var. <i>amara</i>), amêndoa-de-coco, amêndoa-durázio e amêndoa-molar



Fig.2 - *Prunus dulcis* (Jardim Botânico da UTAD, 2016a).

1.1.2. Distribuição geográfica e importância económica

A cultura do amendoal remonta à antiguidade. Na Grécia, a sua cultura foi iniciada há 4000 a 3000 anos a. C. e em Itália há cerca de 300 anos a. C. (Pereira, 2009). Atualmente, é na Bacia Mediterrânica até à Europa Central e na América do Norte, onde esta cultura apresenta uma maior importância económica (Monteiro *et al.*, 2003; Jardim Botânico da UTAD, 2016a). Na Península Ibérica, a amendoeira é cultivada em quase todo o território, com maior incidência a Este e Sul e nas ilhas Baleares. Em Portugal, apesar de dispersa por todo o país, as principais regiões produtoras são Trás-os-Montes e Alto Douro, o Algarve e a Beiral Litoral (GPP, 2007a).

A cultura do amendoal constitui um bom recurso agronómico para as regiões produtoras, pois o seu fruto é um produto com aproveitamento em fresco e transformado, com uma elevada capacidade de conservação. Para além da

exploração óbvia do fruto para a alimentação e gastronomia (Pereira, 2009), os óleos essenciais extraídos das amêndoas são usados na produção de licores, apresentam propriedades medicinais e são amplamente utilizados na indústria cosmética. Para além disso, a amendoeira é também utilizada como uma árvore ornamental pela sua floração vistosa e perfumada, sendo as paisagens dos amendoeais em flor alvo de grande interesse turístico (Monteiro *et al.*, 2003; Pereira, 2009; Parque de Serralves, 2016b).

1.1.3. Exigências edafoclimáticas e principais pragas e doenças

A amendoeira é uma cultura bem adaptada a climas temperados, com invernos suaves e húmidos e verões quentes e secos (Monteiro *et al.*, 2003; Pereira, 2009). Como todas as culturas, esta espécie está sujeita a numerosos fatores, que direta ou indiretamente afetam negativamente a sua produção. Os fatores edafoclimáticos, as diferentes variedades, bem como as pragas e as doenças podem estar na origem do fracasso desta cultura (Grasselly e Duval, 1997; Monteiro *et al.*, 2003).

Apesar da rusticidade desta árvore a condições de seca, a amendoeira é pouco tolerante ao frio (Grasselly e Duval, 1997; Muñoz, 2002), embora necessite entre 200 a 400 horas de frio (abaixo de 7 °C) para a indução e diferenciação florais. Esta cultura exige também um longo período de maturação do fruto, sendo a mais precoce das árvores de fruto pois floresce entre os meses de março e abril, constituindo um indicador do início da Primavera (Parque de Serralves, 2016b). A colheita dos frutos, as amêndoas, é realizada em duas épocas: a colheita em verde, em julho e a colheita em seco, no final do verão em setembro e outubro (Pereira, 2009; Parque de Serralves, 2016b).

A amendoeira apresenta preferência por solos muito permeáveis, como os solos ligeiramente arenosos e profundos, e com cerca de 5% a 10% de calcário (Pereira, 2009). O pH do solo mais adequado para esta cultura varia entre 7 e 8.5. Os solos muito compactos e húmidos são prejudiciais à amendoeira pois esta é sensível à asfixia radicular (Grasselly e Duval, 1997; Muñoz, 2002).

A amendoeira é sensível a alguns fungos, bactérias, vírus e pragas que afetam o seu desenvolvimento e produção (Pereira, 2009). Os principais agentes fúngicos causadores de doenças na amendoeira são *Rosellinia necatrix* ou podridão branca da raiz, *Armillaria mellea* ou podridão radicular, *Verticillium dahlia*, *Stigmata carpophila* ou crivado, *Gloeosporium amygdalinum* ou antracnose, *Fusicoccum amygdali* ou cancro fusicoco e *Fusicladium carpophilum* ou pedrado da amendoeira (Pereira, 2009; Ferreira *et al.*, 2012).

A principal doença bacteriana da amendoeira é causada por *Pseudomonas syringae* e caracteriza-se pela necrose dos rebentos e das folhas jovens (Pereira, 2009). Relativamente às doenças virais da amendoeira, as mais importantes são causadas pelos vírus PDV (*Prunus Dwarf Virus*), ApMV (*Apple Mosaic Virus*) e CLSV (*Chlorotic Leaf Spot Virus*) (Pereira, 2009).

Finalmente, as principais pragas que afetam esta cultura são os insetos *Anarsia lineatella*, *Grapholita molesta*, *Monosteira unicastata* ou percevejo da amendoeira, *Zeuzera pyrina* ou broca e os ácaros *Panonychus ulmi* ou aranhaço vermelho e *Tetranychus urticae* ou aranhaço amarelo (Pereira, 2009; Ferreira *et al.*, 2012).

1.1.4. Cultura do amendoal

O amendoal, uma das culturas tradicionais portuguesa, representa cerca de 45% do total da área cultivada de frutos secos no nosso país (GPP, 2007a). Esta cultura encontra-se distribuída por todo o território continental português, contudo, as principais regiões produtoras são a região Norte, especialmente a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, o Algarve e a Beira Litoral. Na região transmontana, uma parte significativa da produção está concentrada em pequenos e médios produtores, com empresas do tipo familiar (GPP, 2007a; Pereira, 2009; OMAIAA, 2011b; INE, 2016). No Algarve, a amendoeira faz parte integrante do pomar tradicional de sequeiro, sendo encontrada em pomares exclusivos de amendoeira ou em associação com outras espécies como a figueira, a alfarrobeira e a oliveira (Pereira, 2009). A impossibilidade de mecanização nas áreas tradicionais da cultura do amendoal, associada à baixa rentabilidade da exploração do seu fruto, fazem com que o contributo do Algarve para a produção nacional seja pequeno (GPP, 2007a; OMAIAA, 2011b; INE, 2016). Na região do Alentejo, potenciado pela construção da barragem do alqueva e pelas condições agronómicas dos terrenos agrícolas, verifica-se nos últimos anos um aumento exponencial da cultura do amendoal, em modo semi-intensivo e intensivo, à semelhança da cultura do olival, já existente nessa região. No nosso país, as variedades de amendoeira mais importantes são a Parada, a Bonita, a Mourisca, a Boa Casta, a Marcelina Grada e a Pegarinhos (Monteiro *et al.*, 2003; GPP, 2007a).

Em 2015, existiam em Portugal 30150 hectares de amendoal, mais 1279 hectares que em 2014. Da mesma forma, a produção nacional de amêndoa em 2015 foi de 10090 toneladas, mais 1056 toneladas que em 2014. Relativamente à produção nacional de árvores de fruto, em 2015 produziram-se 2481645 árvores de fruto, menos 18.310 que no ano anterior. Apesar deste decréscimo na produção nacional de árvores de fruto, em 2015 produziram-se 78722 amendoeiras, mais 8458 que em 2014 (INE, 2016).

Estes dados confirmam a crescente aposta nesta cultura, que é considerada atualmente como a cultura economicamente mais rentável em Portugal, na classe dos frutos secos (Bento, 2017).

A nível mundial, a produção de amêndoa encontra-se distribuída essencialmente por três continentes: a América (45%), a Europa (23%) e a Ásia (21%) (GPP, 2007a). Os EUA lideram a produção, tendo sido responsáveis em 2013 por 62,2% da amêndoa produzida em todo o mundo (FAOSTAT, 2015).

Nos últimos anos tem-se vindo a verificar uma tendência mundial de aumento da cultura do amendoal (FAOSTAT, 2015), o que demonstra o grande interesse nesta cultura. Em 2012, 31% da produção mundial de frutos secos correspondia à amêndoa (INE, 2013). Em Portugal, foi criado em 2014, o Centro Nacional de Competência dos Frutos Secos (CNCFS) com o objetivo de dinamizar a fileira dos frutos secos no nosso país (www.cncfs.pt).

Atualmente, os maiores países exportadores de amêndoa são os EUA, a Espanha, a China, a Austrália, a Holanda e a Alemanha e os maiores países importadores são a Alemanha, a Espanha, a China, os Emirados Árabes Unidos (EAU) e a Itália (FAOSTAT, 2015).

Relativamente à balança comercial portuguesa, em 2015, o nosso país importou cerca de 3116 toneladas de amêndoa, essencialmente de miolo de amêndoa, correspondentes a 19415000€ e exportou 2772 toneladas, maioritariamente de amêndoa com casca, correspondentes a apenas 5556000€ (INE, 2016). O principal mercado para a amêndoa portuguesa é a Espanha e os principais fornecedores do mercado nacional são a Espanha e os EUA (GPP, 2007a).

1.2. A noqueira

1.2.1. Centro de origem, características gerais e classificação taxonómica

Devido à longa história de cultivo da noqueira, *Juglans regia* (Figura 3), o centro de origem desta espécie não é claro (Stanford *et al.*, 2000). Muito provavelmente, a noqueira é nativa do Mediterrâneo (Europa do Sul e Ásia ocidental) e Ásia Central, sendo a cadeia montanhosa dos Himalaias em Caxemira, no Tajiquistão e Quirguistão, o local onde se considera o seu centro de origem (De Rigo, 2016). Contudo, algumas evidências fósseis mostram que a noqueira foi introduzida no Quirguistão há apenas 1000 a 2000 anos para fins agrícolas (Beer, 2008), e revelam um cultivo mais antigo na região do Mediterrâneo, mais precisamente no Sul de França há cerca de 17000

anos, na Itália há cerca de 6000 anos e na Anatólia, Nordeste da Grécia e Croácia há cerca de 4000 anos (Kaltenrieder *et al.*, 2010).

A noqueira é uma árvore caducifólia de grande porte que pode atingir os 30 metros de altura (Mohani *et al.*, 2009; Parque de Serralves, 2016a). O seu fruto, a noz, é uma drupa com cerca de 4 a 6 cm e um peso até 18 g (Ercisli *et al.*, 2012; Parque de Serralves, 2016a).

A noqueira é uma espécie diplóide ($2n=32$), do tipo monóica e de reprodução autogâmica (Jardim Botânico da UTAD, 2016b; Parque de Serralves, 2016a). Em média, esta árvore vive entre 100 a 200 anos contudo, existem exemplares milenários. A classificação taxonómica da noqueira é apresentada no quadro seguinte.

Quadro 2 - Classificação taxonómica da noqueira (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Jardim Botânico da UTAD, 2016b; Parque de Serralves, 2016a).

Reino	<i>Plantae</i>
Super-divisão	<i>Spermatophyta</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Sub-divisão	<i>Magnoliophytina (Angiospermae)</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sub-classe	<i>Hamamelididae</i>
Ordem	<i>Fagales</i>
Família	<i>Juglandaceae</i>
Sub-família	<i>Juglandoideae</i>
Género	<i>Juglans</i>
Espécie (sinónimas)	<i>Juglans regia</i>
Nome comum	noqueira, noqueira-comum, noqueira-europeia



Fig.3 - *Juglans regia* (Jardim Botânico da UTAD, 2016b; Iannamico, 2009).

1.2.2. Distribuição geográfica e importância económica

Durante a pré-história, a noqueira foi amplamente cultivada em todo o hemisfério norte. Atualmente, a sua distribuição no globo varia entre os 10° e 50° de latitude para norte (Fornari *et al.*, 1999). A noqueira pode ser encontrada na maior parte da Europa, à exceção do norte da Europa (De Rigo *et al.*, 2016), e em Portugal encontra-se dispersa um pouco por todo o país. Contudo, as principais regiões produtoras são Trás-os-Montes e o Alentejo (GPP, 2007b).

Para além da exploração óbvia da noz para a alimentação e gastronomia por ser um fruto altamente nutritivo (Nash e Westpfal, 2005; Papoutsis, 2008; Martínez, 2010; De

Rigo, 2016), os óleos extraídos deste fruto são usados como aromatizantes em alimentos, na produção de óleo alimentar, combustíveis, tintas, sabões e vernizes (Duke, 1983). Adicionalmente, são excelentes vermífugos (Parque de Serralves, 2016a). A parte externa da noz é bastante rica em vitamina C, e a partir desta pode ser produzido um corante amarelo-acastanhado (Parque de Serralves, 2016a). Alguns extratos da casca do fruto e das folhas de noqueira são utilizados em todo o mundo na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças (Amaral, 2004), incluindo infeções fúngicas e bacterianas (Noumi *et al.*, 2010), devido à presença de um princípio ativo com propriedades antissépticas chamado juglona (Parque de Serralves, 2016a) ou para aumentar o nível de insulina em pacientes diabéticos através do seu consumo em infusões (Tapsell *et al.*, 2004; Parque de Serralves, 2016a). Estes extratos apresentam também propriedades repelentes de insetos e cicatrizantes de feridas. As cascas das nozes são igualmente aproveitadas para a extração de óleos usados na alimentação humana, como agentes antiderrapantes para pneus e na produção de carvão ativado (Duke, 1983).

A madeira da noqueira é uma madeira de alta qualidade, dura, homogénea e fácil de trabalhar (Duke, 1983; Jardim Botânico da UTAD, 2016b; Parque de Serralves, 2016a). Para além disso, é resistente à intempérie e a ataques fúngicos, mas não a insetos (Jardim Botânico da UTAD, 2016b). Por estes motivos, é amplamente utilizada em revestimentos, laminados, pavimentação e como madeira maciça em marcenaria de luxo, tornearia e coronhas de armas de fogo. Adicionalmente, estas árvores apresentam um grande valor ornamental (Duke, 1983).

1.2.3. Exigências edafoclimáticas e principais pragas e doenças

A noqueira é uma cultura bem adaptada a climas temperados (Yari *et al.*, 2014a), mas bastante exigente relativamente às condições de cultura. Apesar de suportar e requerer frios intensos no inverno, é sensível às geadas primaveris tardias necessitando de um período vegetativo minimamente prolongado e quente. Se estas condições não forem satisfeitas o desenvolvimento vegetativo e a produção de órgãos florais são fortemente comprometidos (Clark *et al.*, 2008).

Normalmente, a noqueira floresce entre os meses de abril e maio e os frutos amadurecem em outubro. Para a Península Ibérica em geral, a noqueira é considerada uma espécie de meia-luz (Jardim Botânico da UTAD, 2016b) pois requer proteção lateral do sol e de ventos fortes, pelo menos, durante os primeiros anos de vida.

A noqueira apresenta preferência por solos profundos com um mínimo de 60 cm, férteis, permeáveis, arejados, neutros ou ligeiramente ácidos (pH entre 6 e 7.5) e com algum teor em calcário (Mohani, 2009; Jardim Botânico da UTAD, 2016b). Adicionalmente, o solo deve apresentar alguma vegetação, fonte de húmus, pois a noqueira é uma cultura bastante exigente em termos de sais minerais (Jardim Botânico da UTAD, 2016b).

A noqueira é sensível a alguns fungos, bactérias, vírus e pragas. Os principais agentes fúngicos causadores de doenças na noqueira são *Armillaria mellea* ou podridão radicular, *Phytophthora cinamomii*, *Phytophthora cambivora*, *Gnomonia leptostyla* ou antracnose, *Brennaria rubrifaciens* ou cancro da casca profunda, *Brennaria nigrifluens* ou cancro da casca rasa e *Hendersonula Toruloidea* (Ferreira et al., 2012; UC Davis, 2016).

A bacteriose, provocada pela bactéria *Xanthomonas juglandis*, é uma das principais doenças bacterianas desta árvore de fruto. Esta doença afeta principalmente os gomos ativos, os ramos jovens, as folhas, as flores e os frutos. A bacteriose surge, normalmente, em todos os pomares de noqueiras e pode afetar todas as variedades (Ferreira et al., 2012). Os sintomas mais graves, que podem culminar com a morte da árvore, verificam-se nas variedades de floração precoce (Hemery et al., 2010). Outra das principais doenças bacterianas da noqueira é o *crown gall* causada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. O *crown gall* manifesta-se por grandes crescimentos irregulares na base da árvore e a consequente redução do transporte de água e nutrientes através dos tecidos condutores (UC Davis, 2016).

A principal doença viral que afeta a noqueira é a doença da Linha Preta (do inglês *blackline*), causada pelo vírus CLVR (do inglês *Cherry leaf roll virus*) (McGranhan, 2007; UC Davis, 2016). Este vírus penetra através do pólen na flor feminina e move-se na planta por translocação, formando uma área de tecido necrótico conhecido como "linha preta" ou "*blackline*" que impede o transporte de nutrientes através dos tecidos condutores (Iannamico, 2009). Esta doença surge em quase todas as zonas frutícolas do mundo. Nas espécies tolerantes, como *Juglans regia*, leva à redução do rendimento das plantas, enquanto que nas espécies hipersensíveis, como são as restantes espécies do género *Juglans*, pode ser letal (Iannamico, 2009).

Finalmente, as principais pragas que afetam a noqueira são os nemátodes *Pratylenchus vulnus*, *Mesocriconema xenoplax* e do género *Meloidogyne*, as lagartas *Cydia pomonella* ou bichado e *Schizura concinna*, a mosca *Rhagoletis completa*, a minhoca *Amyeloides transitella*, os pulgões *Chromaphis juglandicola* e *Callaphis juglandis* e o ácaro *Panonychus ulmi* ou aranhaço vermelho (McGranhan, 2007; Ferreira et al., 2012; UC Davis, 2016).

1.2.4. Cultura do nogal

O nogal, uma das culturas tradicionais portuguesa, encontra-se distribuída por todo o território continental português. Contudo, as principais regiões produtoras são Trás-os-Montes e o Alentejo (GPP, 2007b). Na região transmontana, as árvores são exploradas em regime florestal para a produção mista de fruto e madeira, enquanto que no Alentejo, as plantações se destinam essencialmente à produção de fruto, surgindo em pomares modernos com uma forte componente de mecanização (GPP, 2007b; OMAIAA, 2011b; INE, 2016). No nosso país, as variedades de nogueira mais importantes são as americanas (Hartley, Serr, Amigo e Chandler), as portuguesas (Rego e Arco) e as francesas (Franquett e Lara) (GPP, 2007b; OMAIAA, 2011a).

Em 2015, existiam em Portugal 3287 hectares de nogais, mais 341 hectares que em 2014. Apesar do aumento da área de cultura, a produção nacional de noz em 2015 foi de 4062 toneladas, menos 70 toneladas que no ano anterior. Relativamente à produção nacional de árvores de fruto, em 2015 produziram-se 2.481645 árvores de fruto, menos 18310 que no ano anterior. Apesar deste decréscimo na produção nacional de árvores de fruto, em 2015 produziram-se 17662 nogueiras, mais 1749 que em 2014 (INE, 2016).

A nível mundial, a produção de noz encontra-se distribuída essencialmente por três continentes: a Ásia (52%), a Europa (23%) e a América (23%). A China lidera a produção, tendo sido responsável em 2013 por 49,2% da noz produzida em todo o mundo (FAOSTAT, 2015).

Nos últimos anos tem-se vindo a verificar uma tendência mundial de aumento da cultura do nogal (FAOSTAT, 2015), o que demonstra o grande interesse dos países nesta cultura. Em 2012, 15% da produção mundial de frutos secos correspondia à noz (INE, 2013). Em Portugal, como já havia sido referido anteriormente, o CNCFS e os seus associados, desenvolvem esforços para dinamizar toda a fileira dos frutos secos, onde se inclui a cultura do nogal.

Atualmente, os maiores países exportadores de noz são os EUA, a França, a China, o México e o Chile e os maiores países importadores são a China, a Turquia, a Itália, o México e a Espanha (FAOSTAT, 2015).

Relativamente à balança comercial portuguesa, em 2015, Portugal importou cerca de 2020 toneladas de noz, correspondentes a 12704000€ e exportou apenas 173 toneladas, correspondentes a 967000€. O principal mercado para a noz portuguesa é a Espanha e os PALOP sobretudo, Angola e Cabo Verde e os maiores fornecedores do mercado nacional são a França, o Chile e a Espanha (GPP, 2007b).

Pela importância económica destas espécies no nosso país, não é aceitável que a balança comercial portuguesa para estes dois frutos secos seja tão deficitária. De forma a contrariar esta situação, é necessário que haja um aumento da área cultivada, utilizando modos de produção semi-intensivo e intensivo, sistemas de regadio mais eficientes e plantas altamente produtivas, passando esta última, entre outros requisitos, pela utilização de material vegetal selecionado, quer ao nível dos porta-enxertos como das variedades produtoras.

1.3. Os porta-enxertos

As plantas de espécies fruteiras são vulgarmente constituídas por dois genótipos, pertencendo o sistema radicular e uma pequena parte do tronco ao porta-enxertos e a restante parte aérea à variedade enxertada, o garfo. Esta associação é indispensável para a propagação vegetativa (enxertia) da maioria das variedades fruteiras, em consequência da natureza heterozigótica destas espécies (Ramos das Neves, 1997). Devido à grande dificuldade de propagação da nogueira e amendoeira por estacaria, em consequência do fraco enraizamento e da elevada mortalidade durante a aclimatização (Hartmann *et al.*, 2010; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2010) tanto das variedades como dos porta-enxertos, a maioria dos pomares destas culturas é ainda hoje instalada com recurso a porta-enxertos de origem seminal, sobre os quais, ainda no viveiro ou já no local definitivo, é efetuada a enxertia. As funções mais importantes dos porta-enxertos são a absorção de água e nutrientes, a síntese de hormonas, o armazenamento de reservas e o suporte da variedade enxertada (Iannamico, 2009).

A utilização de porta-enxertos na produção frutícola apresenta inúmeras vantagens, nomeadamente a possibilidade de cultura da variedade enxertada em solos para os quais o seu sistema radicular não está adaptado, designadamente solos com problemas de alcalinidade, acidez, salinidade, secura ou presença de agentes patogénicos como fungos, bactérias, vírus e pragas; a possibilidade de regular o vigor da variedade enxertada; a entrada em frutificação pela variedade mais precocemente; o melhoramento de características qualitativas da variedade como o calibre e a coloração dos frutos, o teor em açúcares, a época de maturação, etc. e de características do seu sistema aéreo como o tipo de ramificação e de frutificação que afetam a condução do pomar (poda, colheita e outras operações de cultivo); e finalmente, a possibilidade de contornar fenómenos como a saturação dos solos que impede, por vezes, a replantação de uma espécie repetidamente no mesmo solo (Ramos das Neves, 1997).

Contudo, a enxertia apresenta também alguns inconvenientes dada a influência do porta-enxertos na expressão de numerosas características da variedade enxertada.

Uma das principais dificuldades inerente à utilização de porta-enxertos é a possibilidade de existência de incompatibilidade, viral ou genética, deste com a variedade enxertada (Ramos das Neves, 1997). No primeiro caso, a situação é facilmente ultrapassada através da utilização de material isento de vírus, contudo, a incompatibilidade genética é impossível de contornar (Ramos das Neves, 1997). Outro dos problemas associado à utilização de porta-enxertos é a indução, por vezes, de um vigor excessivo na variedade enxertada que resulta no atraso da maturação ou na falta de coloração dos frutos. Como a interação entre o porta-enxertos e a variedade enxertada é muito importante, a escolha do porta-enxertos deve ser feita em função das condições edafoclimáticas e da variedade em questão, de modo a garantir o sucesso no estabelecimento de um pomar (Iannamico, 2009).

Os porta-enxertos obtidos por via seminal apresentam uma grande variabilidade genética devido à segregação cromossómica e levam consequentemente, ao estabelecimento de pomares heterogéneos, tornando difícil a uniformização das práticas culturais como a colheita, a poda e os tratamentos fitossanitários. Assim sendo, a obtenção de variedades autoenraizadas ou de porta-enxertos clonais constitui um aspeto de extrema importância (Carlos, 2014).

Cada vez mais, a cultura *in vitro* é vista como uma alternativa viável às técnicas clássicas de propagação de plantas (Rom, 1987). A propagação *in vitro* possibilita a obtenção de variedades autoenraizadas (Carlos, 2014) que podem ser utilizadas como porta-enxertos em solos com boas condições de cultura, evitando os fenómenos de incompatibilidade que por vezes existem entre a variedade e o porta-enxertos ou de outros possíveis efeitos negativos induzidos pelo porta-enxertos na variedade. Contudo, a utilização de variedades autoenraizadas é limitada a condições específicas dos solos, quer de natureza físico-química quer biológica, favoráveis ao desenvolvimento do sistema radicular da variedade. Para além disso, o número de variedades passíveis de multiplicar por esta via representa apenas uma pequena fração das variedades utilizadas na fruticultura (Ramos das Neves, 1997). Adicionalmente, a propagação *in vitro* possibilita a obtenção de porta-enxertos clonais eliminando assim, a utilização de porta-enxertos de origem seminal e de todas as desvantagens associadas à heterogeneidade das plantas no pomar (Carlos, 2014). Contudo, existem algumas desvantagens no uso de porta-enxertos clonais como a erosão genética nos pomares e a necessária otimização dos processos de propagação *in vitro*, cultura em viveiro e enxertia com as variedades de interesse, de forma a produzir produtos comercialmente viáveis (Iannamico, 2009; DeBuse *et al.*, 2010 e 2011).

Adicionalmente, é possível fazer a utilização direta de porta-enxertos de outras espécies, assim como de híbridos interespecíficos (Ramos das Neves, 1997).

1.3.1. Porta-enxertos da amendoeira

Os principais porta-enxertos usados na cultura da amendoeira, *Prunus dulcis*, incluem os francos que correspondem às diferentes variedades de amendoeira, algumas variedades de pessegueiro (*Prunus persica*) e de ameixeira (*Prunus cerasifera*) e os híbridos interespecíficos entre o pessegueiro e a amendoeira (*Prunus persica* x *Prunus dulcis*) (Ramos das Neves, 1997).

Os francos de amendoeira, muito utilizados nas regiões mediterrânicas no cultivo de sequeiro, apresentam uma notável resistência a solos com défice hídrico e alto teor em calcário (clorose férrica), contudo, exibem grande sensibilidade a vários agentes patogénicos do solo como a *Phytophthora* e o *Agrobacterium tumefaciens* e à asfixia radicular. Como a amendoeira é uma espécie muito sensível à transplantação, estes porta-enxertos devem ser usados em solos com condições ótimas para o seu cultivo. Os francos de amendoeira são ainda hoje maioritariamente propagados por via seminal, levando a uma grande heterogeneidade das plantas no pomar (Ramos das Neves, 1997).

O pessegueiro é o porta-enxertos tradicionalmente utilizado na cultura de regadio, formando combinações com a amendoeira bastante vigorosas e uniformes no pomar. A principal vantagem do pessegueiro é a menor sensibilidade a agentes patogénicos do solo e à asfixia radicular, contudo, tanto o pessegueiro como a ameixeira apresentam uma grande sensibilidade a solos com défice hídrico e alto teor em calcário (clorose férrica). Para além disso, a longevidade das plantas no pomar é mais reduzida comparativamente a quando se usam os francos como porta-enxertos. A produção destes porta-enxertos é também ainda hoje maioritariamente feita por via seminal (Ramos das Neves, 1997).

Os híbridos entre o pessegueiro e a amendoeira (*Prunus persica* x *Prunus dulcis*) são os porta-enxertos que melhor satisfazem as necessidades de produção da amendoeira (Ramos das Neves, 1997). De um modo geral, estes porta-enxertos apresentam um excelente vigor, aptidão para a propagação vegetativa, resistência a vários agentes patogénicos do solo como os nemátodes do género *Meloidogyne*, resistência a solos com défice hídrico e alto teor em calcário (clorose férrica) e à asfixia radicular (Ramos das Neves, 1997). Estes híbridos podem ser propagados por via seminal, o que permite uma produção muito económica, contudo, cada vez mais é feita a sua propagação vegetativa de forma a garantir a homogeneidade das plantas no pomar

(Ramos das Neves, 1997). Um destes híbridos foi obtido através da polinização da variedade de amendoeira *Titan* com a variedade de pessegueiro *Nemaguard* (Jones, 1969). Em cultura regada e solos muito férteis, o pessegueiro pode ser preferível aos híbridos entre o pessegueiro e a amendoeira, devido ao excessivo vigor induzido nestas condições por estes porta-enxertos nas variedades enxertadas (Ramos das Neves, 1997).

1.3.1.1. O porta-enxertos GF677

O porta-enxertos GF677, também conhecido como *Paramount*, é um híbrido natural entre o pessegueiro (*Prunus persica*) e a amendoeira (*Prunus dulcis*) (Sharifmoghaddam *et al.*, 2011). Este porta-enxertos híbrido é muito vigoroso (Loreti *et al.*, 1985; Maragoni *et al.*, 1985), resistente ao défice hídrico (Rom, 1987; Monticelli *et al.*, 2000) e a solos calcários (clorose férrica) (Kester, 1970, Fasolo *et al.*, 1987; El Ghardi e Jraidi, 1994; Monticelli *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2010; Sharifmoghaddam *et al.*, 2011) e pouco férteis (Charrera *et al.*, 1998; Monticelli *et al.*, 2000). Para além disso, apresenta alguma tolerância à asfixia radicular e à *Phytophthora cactorum* (Rom, 1987; Ramos das Neves, 1997). Contudo, é sensível à *Armillaria* e ao *Agrobacterium tumefaciens* (Rufato *et al.*, s.d.).

O porta-enxertos GF677 foi produzido em França por Bernhard no ano de 1940 (Stylianides *et al.*, 1988) e selecionado em 1950 pelo seu vigor e tolerância da parte aérea às doenças criptogâmicas (Ramos das Neves, 1997). Atualmente, é usado em todo o mundo como porta-enxertos tanto para o pessegueiro como para a amendoeira, bem como para a ameixeira e algumas variedades de damasqueiro, pois é compatível com a maioria das variedades destas espécies (Kester, 1970; Fasolo *et al.*, 1987; Grassely, 1987; Antonopoulou *et al.*, 2004; Alanagh *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 2010). As variedades enxertadas em GF677 apresentam-se mais vigorosas e produtivas (Maragoni *et al.*, 1985; Minguzzi, 1989). Atualmente, este porta-enxertos é propagado vegetativamente por estacaria e através das técnicas de cultura *in vitro* (Rom, 1987; Dimassi e Economou, 1995; Ramos das Neves, 1997).

1.3.2. Porta-enxertos da noqueira

Os principais porta-enxertos usados na cultura da noqueira-comum, *Juglans regia*, incluem os francos que correspondem às diferentes variedades de noqueira, as noqueiras negras americanas, principalmente *Juglans hindsii* e *Juglans nigra*, e os híbridos interespecíficos entre a noqueira-comum e a noqueira negra do norte da

Califórnia (*Juglans regia* x *Juglans hindssi*), conhecidos como híbridos Paradox (Iannamico, 2009; DeBuse *et al.*, 2010 e 2011; Carlos, 2014)

A noqueira-comum, *Juglans regia*, constitui um porta-enxertos bastante rústico e de excelente comportamento na maioria das condições de cultura. Relativamente aos restantes porta-enxertos, tolera melhor o défice hídrico e os solos calcários (clorose férrica), contudo, é sensível à asfixia radicular e à *Phytophthora*. Para além disso, é o único porta-enxertos resistente à doença da “Linha Preta” causada pelo vírus CLVR (Iannamico, 2009; UC Davis, 2016). O grande vigor e compatibilidade de *J. regia*, torna-a adequada como porta-enxertos das variedades de noqueira menos produtivas (Iannamico, 2009; UC Davis, 2016). Atualmente, a maioria das variedades de noqueira são ainda enxertadas em *J. regia* obtida por via seminal (Hartmann *et al.*, 2010; Carlos, 2014).

A noqueira negra do norte da Califórnia, *Juglans hindssi*, é um porta-enxertos também vigoroso e o menos sensível ao *Agrobacterium tumefaciens* (Hasey *et al.*, 2015; UC Davis, 2016), contudo, é sensível ao défice hídrico, a solos calcários (clorose férrica) e muito sensível ao vírus CLVR e à *Phytophthora* (Iannamico, 2009). Apesar disso, em solos ligeiramente salinos, húmidos e pouco compactos, *J. hindssi* apresenta um melhor comportamento comparativamente a *J. regia* (Iannamico, 2009). Este porta-enxertos foi bastante difundido por todo o mundo, contudo, está a ser gradualmente substituído por *J. regia* e pelos híbridos Paradox (Iannamico, 2009; UC Davis, 2016).

A noqueira negra do leste dos EUA, *Juglans nigra*, começou a ser utilizada como porta-enxertos em França nos anos 70, no entanto, este porta-enxertos apresenta um baixo vigor, longevidade e é sensível ao défice hídrico, a solos calcários (clorose férrica) e ao vírus CLRV (Iannamico, 2009; UC Davis, 2016), o que levou à decadência do seu uso. Na realidade, *J. nigra* é o porta-enxertos de noqueira menos vigoroso, pelo que é apenas recomendado o seu uso com variedades muito vigorosas e produtivas, de forma a levar à diminuição do seu vigor e ao aumento da sua precocidade.

Finalmente, a partir da década de 50 do século XX, alguns híbridos naturais entre a noqueira-comum (*J. regia*) e a noqueira negra do norte da Califórnia (*J. hindssi*) passaram a ser os porta-enxertos mais utilizados (Carlos, 2014). De um modo geral, caracterizam-se por serem extremamente vigorosos (Iannamico, 2009).

Quadro 3 - Comparação entre porta-enxertos de noqueira relativamente a fatores edafoclimáticos, pragas e doenças (Adaptado de Iannamico, 2009; Hasey *et al.*, 2015).

	<i>J. regia</i>	<i>J. hindsii</i>	<i>J. nigra</i>	Paradox
Vigor	Alto	Médio	Baixo	Muito alto
Precocidade	Média	Média	Alta	Média
Salinidade	--	-	-	--
Asfixia radicular	--	-	-	+
Défice hídrico	+	-	--	+
Clorose férrica	+	-	-	+
Nemátodes (2)	--	-	-	--
CLVR	++ (1)	---	---	---
<i>Phytophthora</i>	--	--	+	-
<i>Agrobacterium</i>	-	-	+	--
<i>Armillaria</i>	-	Variável	-	Variável

Legenda: 1) Embora tolerante, apresenta redução do vigor e/ou produtividade; 2) Sensibilidade geral, variável para nemátodes específicos; ++ Tolerante (assintomático); + Medianamente tolerante; - Algo sensível; -- Sensível e --- Hipersensível.

1.3.2.1. Os híbridos Paradox

Os híbridos naturais entre a noqueira-comum (*J. regia*) e a noqueira negra do norte da Califórnia (*J. hindsii*) são comumente conhecidos como híbridos Paradox (Iannamico, 2009; DeBuse *et al.*, 2010 e 2011; Carlos, 2014). Foram descobertos em 1914 por Luther Burbank e são atualmente os porta-enxertos mais utilizados para a noqueira destinada à produção de fruto. Estes híbridos foram os primeiros a serem considerados do tipo Paradox, contudo, atualmente o conceito foi alargado e o termo Paradox aplica-se a qualquer planta híbrida resultante do cruzamento natural ou controlado entre a noqueira-comum (*J. regia*) e as noqueiras negras americanas (*J. hindsii*, *J. nigra*, *J. major*, *J. microcarpa*, *J. californica*, *J. australis*, *J. mollis*, *J. neotropica*, *J. olanchana*, *J. guatemalensis*).

A seleção de híbridos entre *J. regia* e *J. hindsii* conduziu à obtenção de três indivíduos designados por Vlach, VX211 e RX1, os dois últimos com patente que protege os direitos de obtentor (McGranhan, 2007). Como são plantas de reprodução do tipo alogâmica (polinização aberta) apresentam uma elevada variabilidade genética quando obtidas por via seminal, conduzindo à heterogeneidade do pomar (DeBuse *et al.*, 2010 e 2011). Por esse motivo, atualmente estes porta-enxertos são cada vez mais propagados vegetativamente recorrendo à técnica de *cultura in vitro* (Iannamico, 2009; DeBuse *et al.*, 2010 e 2011; Carlos, 2014).

Vlach é o híbrido Paradox mais divulgado em todo o mundo, foi o primeiro a ser propagado *in vitro* e apresenta mais de 10 anos de avaliação do seu comportamento em pomares. Para além disso, é vigoroso, sensível a nemátodes e apresenta baixa resistência à *Phytophthora* e ao *Agrobacterium tumefaciens*. VX211 é muito vigoroso, resistente a nemátodes, moderadamente resistente à *Phytophthora citricola* e apresenta baixa resistência à *Phytophthora Cinnamomi* e ao *Agrobacterium tumefaciens*. Por fim, RX1 é menos vigoroso que VX211 e Vlach, é sensível a nemátodes, moderadamente a altamente resistente à *Phytophthora citricola*, muito resistente à *Phytophthora Cinnamomi* e moderadamente resistente ao *Agrobacterium tumefaciens* (Iannamico, 2009; Hasey *et al.*, 2015; Simpósio Nacional de Frutos Secos, 2016; Peixe *et al.*, 2016; UC Davis, 2016).

De um modo geral, os porta-enxertos Paradox são mais vigorosos e resistentes à *Phytophthora* comparativamente a *J. regia* e a *J. hindsii*, contudo, apresentam uma maior sensibilidade ao *Agrobacterium tumefaciens* e ao vírus CLVR que provoca a doença da “Linha Preta” (Iannamico, 2009; Hasey *et al.*, 2015; Simpósio Nacional de Frutos Secos, 2016; UC Davis, 2016). Adicionalmente, possuem um forte sistema radicular que permite que se adaptem facilmente a diferentes tipos de solo, à exceção dos solos asfixiantes. Para além disso, apresentam uma boa compatibilidade com as diferentes variedades de *J. regia* conferindo-lhes normalmente, um maior vigor, produtividade e precocidade (Iannamico, 2009).

As inúmeras vantagens apresentadas pelos porta-enxertos de amendoeira e nojeira, GF677 e Vlach, respetivamente, fizeram com que nos últimos anos se verificasse um aumento substancial na procura do mercado. A propagação *in vitro* destes porta-enxertos constitui o melhor método para a obtenção de um maior número de plantas com qualidade genética e fitossanitária. Apesar de serem já reproduzidos *in vitro*, existem ainda algumas limitações como os elevados custos de produção e a dificuldade em obter um elevado número de plantas. A crescente procura do mercado justificou assim a necessidade da Deifil em implementar, desenvolver e otimizar protocolos de produção *in vitro* para ambos os porta-enxertos.

1.4. A cultura *in vitro*

O conceito de totipotência celular surgiu pela primeira vez nos anos de 1838-1839 na Teoria Celular proposta por Schleiden e Schwann (Vasil *et al.*, 1979). A totipotência celular caracteriza-se pela capacidade de uma célula vegetal viva em reproduzir por completo a planta-mãe (organismo multicelular) de onde foi obtida, por um processo mitótico e de diferenciação regenerativa (Dodds e Roberts, 1986). Este processo

completo de regeneração depende do fornecimento externo de um meio de cultura nutritivo e de condições ambientais apropriadas. O potencial das células ou tecidos vegetais em formar todos os tipos de células e regenerar uma planta completa, constitui o princípio básico da cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais.

A cultura *in vitro* consiste na cultura de pequenas secções de tecidos ou órgãos vegetais (explantes) em condições de assepsia, num meio de cultura nutritivo de composição definida e sob condições ambientais controladas (Altman, 2000; Kumar e Reddy, 2011; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011). As primeiras tentativas de culturas *in vitro* de monocotiledóneas e brassicáceas ocorreram no início do século XX, partindo de explantes como embriões, partes de plantas e tecido caloso (ou *callus*). Nos anos 30, foi identificado o primeiro regulador de crescimento, a auxina IAA (ácido 3-indolil-acético), e a partir da segunda metade do século XX houve um considerável desenvolvimento desta técnica, do espectro em termos de espécies vegetais e do tipo de órgãos usados como explantes (Dodds e Roberts, 1986).

A cultura *in vitro* de tecidos vegetais é amplamente utilizada como uma importante ferramenta em diversas áreas científicas como Fisiologia do Desenvolvimento, Bioquímica, Citologia, Histologia, Genética, Fitopatologia, Melhoramento de Plantas, Citogenética, entre outras, tendo ainda um grande potencial na área da Biotecnologia Vegetal. Nos últimos anos, esta técnica tem vindo a tornar-se numa ferramenta cada vez mais importante, tanto para aplicações científicas como comerciais (Fiorino e Loreti, 1987; Kumar e Reddy, 2011; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011).

A cultura *in vitro* apresenta inúmeras vantagens em relação aos métodos de propagação convencionais das plantas. As principais vantagens da propagação *in vitro* são a facilidade e rapidez de obtenção de material vegetal previamente selecionado, a grande quantidade de material vegetal que é possível produzir *in vitro*, a manutenção do genótipo (uniformidade) e da qualidade fitossanitária (assepsia) do material vegetal, o reduzido espaço de tempo e espaço físico requeridos e a eliminação do efeito de sazonalidade já que as condições físicas e nutritivas são rigorosamente controladas (Pierik, 1997; Brito *et al.*, 2007; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011). A principal desvantagem desta técnica prende-se com os elevados custos iniciais.

À propagação *in vitro* de plantas de genótipos selecionados, utilizando a técnica de cultura *in vitro* de tecidos vegetais, dá-se o nome de micropropagação. A micropropagação de plantas é uma técnica utilizada industrialmente para a produção de plantas em grande escala. Esta técnica é também designada habitualmente por clonagem de plantas, pois permite a produção de milhares de plantas (clones) a partir da cultura *in vitro* de células ou tecidos obtidos de uma planta-mãe selecionada (Carlos, 2014).

1.4.1. Métodos de regeneração clonal *in vitro*

De acordo com o tipo de explante inicial e a composição do meio de cultura utilizado na propagação *in vitro* podem ocorrer três processos distintos de regeneração clonal: a rebentação adventícia ou organogénese (formação de rebentos e/ou raízes adventícias), a embriogénese somática (formação de embriões somáticos) e a rebentação axilar (formação de rebentos axilares) (Carlos, 2014).

A rebentação axilar, ou seja, a formação de rebentos axilares, ocorre através da cultura e indução *in vitro* de meristemas apicais e/ou axilares (Iliev *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 2010). A estimulação do desenvolvimento de gomos meristemáticos pré-existentes no explante inicial é feita através da sua inoculação em meio de cultura nutritivo adequado à proliferação de rebentos.

Os meristemas são grupos de células desdiferenciadas formados durante a embriogénese da planta (Hay e Tsiantis, 2005). Estas células têm a capacidade de se dividirem continuamente em novas células que se diferenciam em tecidos e órgãos, produzindo a estrutura básica de uma planta (Castellano e Sablowski, 2005). A principal vantagem no uso destas células é a elevada probabilidade de ausência de organismos patogénicos, apesar de estes poderem estar presentes na planta-mãe (Iliev *et al.*, 2010). Atualmente, este é o método de micropropagação mais frequentemente usado na produção comercial de plantas em grande escala (Iliev *et al.*, 2010) e em espécies onde as técnicas de propagação *in vitro* estão a dar os primeiros passos (Carlos, 2014).

A organogénese, ou seja, a formação de rebentos e/ou raízes adventícias, ocorre através da cultura e indução *in vitro* de estruturas diferenciadas da planta como folhas, caules ou raízes (Quisen e Angelo, 2008). Neste caso, a organogénese diz-se direta (Iliev *et al.*, 2010). Caso se verifique a formação intermédia de *callus*, a organogénese diz-se indireta (Monteiro, 2007; Iliev *et al.*, 2010; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Carlos, 2014). A principal desvantagem da organogénese é a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal.

A embriogénese somática consiste no desenvolvimento a partir de células somáticas vegetais, de estruturas que posteriormente sofrem histodiferenciação, dando origem a embriões somáticos similares aos embriões zigóticos, apesar de não resultarem de uma fusão gamética (Iliev *et al.*, 2010). Para isso, é necessário que ocorra nestas células a transição da expressão génica somática pela expressão génica embriogénica. Assim, na presença de sinais indutores da embriogénese no meio de cultura, ocorrem várias divisões celulares formando-se *callus*, a partir do qual se podem diferenciar os embriões somáticos. Estas células somáticas denominam-se por

células embriogénicas induzidas ou células embriogenicamente determinadas após indução. Neste caso, a embriogénese somática diz-se indireta pois envolve a formação intermédia de *callus* (Monteiro, 2007; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Carlos, 2014;). A expressão do programa genético embriogénico está fortemente relacionada com sinais indutores, normalmente auxinas (ex. 2,4-D e ANA) ou fatores de *stress*, que conduzem a alterações na estrutura da cromatina, à ativação da transcrição e à indução de divisões celulares (Trigiano e Gray, 2005).

Quando a cultura e indução *in vitro* é feita a partir de células provenientes de um embrião zigótico e portanto, que expressam o programa embriogénico (células pré-embriogenicamente determinadas) é suficiente um estímulo para que ocorra a diferenciação de embriões somáticos. Neste caso, a embriogénese somática diz-se direta (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011).

1.4.2. Principais dificuldades da cultura *in vitro*

Durante o processo de cultura *in vitro* podem surgir inúmeras dificuldades. Uma das principais dificuldades é a manutenção da assepsia, isto é, o evitar do desenvolvimento de infeções fúngicas e bacterianas no material vegetal (Quisen e Angelo, 2008). Este aspecto é extremamente importante, uma vez que o principal objetivo da cultura *in vitro* é não só produzir plantas de qualidade genética mas também fitossanitária. Nesse sentido, previamente ao estabelecimento do material vegetal *in vitro* é feita a desinfecção química dos explantes. Posteriormente, o seu estabelecimento *in vitro* é realizado numa câmara de fluxo laminar que assegura igualmente um ambiente assético. Para além disso, antes da manipulação do material vegetal é feita a desinfecção das mãos do operador, da bancada de trabalho e das pinças e bisturis. Os próprios meios e recipientes de cultura utilizados são previamente esterilizados. Todos estes procedimentos contribuem para a criação de um ambiente assético (Quisen e Angelo, 2008).

Outro dos principais problemas que pode ocorrer durante a cultura *in vitro* consiste na exsudação por parte dos explantes colocados em meio de cultura, através da sua zona de corte, de compostos químicos como fenóis e pigmentos (George, 1996). Esta situação pode conduzir à oxidação dos tecidos vegetais e do meio de cultura, estando muitas vezes associada com uma fraca taxa de estabelecimento da cultura e a sua reduzida capacidade de regeneração (taxa de multiplicação). A minimização dos danos provocados nos explantes aquando do seu isolamento da planta-mãe, a sua desinfecção e frequente subcultura para meio de cultura novo com a excisão dos tecidos oxidados, bem como a adição ao meio de cultura de agentes quelantes como o

carvão ativado e/ou agentes antioxidantes como o ácido ascórbico, ácido cítrico, etc. são estratégias que podem ajudar a prevenir os sintomas de oxidação (George, 1996; Quisen e Angelo, 2008).

Outra das principais dificuldades durante a cultura *in vitro* é a ocorrência de hiperhidricidade dos tecidos (ou vitrificação), detetada pela aparência translúcida e quebradiça das estruturas vegetais (Castellano e Sablowski, 2005; Quisen e Angelo, 2008). A vitrificação consiste numa manifestação fisiológica causada pela excessiva absorção de água pelos tecidos vegetais e que pode ser desencadeada por diversos fatores como a elevada concentração de citocininas no meio de cultura, a baixa concentração do agente gelificante no meio de cultura ou a elevada condensação de água nos recipientes de cultura por estarem demasiado fechados (Quisen e Angelo, 2008).

Finalmente, a variação somaclonal é outro dos principais problemas que pode ocorrer durante a regeneração *in vitro*, principalmente na forma de rearranjos cromossómicos (Jain, 2001). A variação somaclonal é mais comum em plantas regeneradas a partir de *callus*, pois o processo de regeneração envolve um maior número de divisões celulares e portanto, apresenta uma maior probabilidade de ocorrência de rearranjos cromossómicos. Esta variação pode ser genotípica ou fenotípica, e neste último caso pode ter uma origem genética ou epigenética. A identidade clonal do material propagado vegetativamente pode ser confirmada através de análises citológicas, bioquímicas e moleculares.

1.4.3. Fatores que condicionam o sucesso da cultura *in vitro*

O sucesso geral do processo de cultura *in vitro* depende de uma série de fatores como o genótipo da planta (Scaltsoyiannes *et al.*, 1997; Kumar e Reddy, 2011; Carlos 2014; Nezami *et al.*, 2014), o tipo de explante inicial (Kumar e Reddy, 2011; Carlos, 2014; Nezami *et al.*, 2014), a estação do ano (Augé *et al.*, 1989; Yari *et al.*, 2014b), a composição do meio de cultura (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Yari *et al.*, 2014a; Nezami *et al.*, 2014) e as condições ambientais fornecidas (Read e Preece, 2003; Kumar e Reddy, 2011; Nezami *et al.*, 2014).

1.4.3.1. Genótipo da planta

O genótipo da planta-mãe desempenha um papel fundamental no sucesso da cultura *in vitro*, pois condiciona a capacidade de adaptação e resposta dos explantes em cultura, a sua taxa de multiplicação, a capacidade de enraizamento, assim como a

posterior facilidade de aclimatização (Scaltsoyiannes *et al.*, 1997; Kumar e Reddy, 2011; Carlos, 2014; Nezami *et al.*, 2014).

1.4.3.2. Tipo de explante

A escolha do tipo de explante inicial é um aspeto de extrema importância para a otimização de qualquer protocolo de cultura *in vitro* (Kumar e Reddy, 2011; Carlos, 2014; Nezami *et al.*, 2014). O tipo de explante é influenciado por diversos fatores como o tipo de órgão, o tamanho do explante, a idade, o estado fisiológico e fitossanitário da planta-mãe, a estação do ano e a via de regeneração clonal pretendida.

Os principais tipos de explantes usados na cultura *in vitro* são folhas, pecíolos, entrenós de caules, raízes, meristemas, cotilédones, hipocótilos, epicótilos, flores, bolbos, embriões zigóticos, *callus* e protoplastos (Kumar e Reddy, 2011). Os diversos tipos de explantes exibem diferentes comportamentos *in vitro* devido ao diferente nível de reguladores de crescimento endógenos. A folha é a parte da planta mais comumente utilizada para a regeneração *in vitro* devido à sua maior área superficial disponível (Kumar e Reddy, 2011).

A idade, o estado fisiológico e fitossanitário da planta-mãe e consequentemente, do explante inicial são fatores de extrema importância no sucesso da cultura *in vitro* (Carlos, 2014). Os explantes mais próximos da condição juvenil e mais saudáveis respondem invariavelmente melhor do que os adultos e com contaminações. Deste modo, o rejuvenescimento prévio de árvores adultas por podas vigorosas que forcem a rebentação de gomos no cone juvenil da planta ou a enxertia em cascata são procedimentos frequentemente utilizados para o efeito (Peixe, comunicação pessoal, citado em Carlos, 2014). Os explantes retirados de plantas jovens obtidas por via seminal são os que melhor respondem *in vitro*, sendo por isso frequentemente utilizados durante as fases iniciais do desenvolvimento de protocolos de cultura *in vitro* (Carlos, 2014). Contudo, quando o objetivo é a propagação clonal de uma planta específica, em espécies alogâmicas a sua utilização está condicionada, pois estes apresentam um elevado grau de heterozigocidade e conduzem a populações de plantas heterogéneas.

A origem do explante (*in vitro* ou *ex vitro*) é também um aspeto muito importante no sucesso da cultura *in vitro* pois influencia a sua capacidade de regeneração (Kumar e Reddy, 2011). De um modo geral, os explantes de origem *in vitro* apresentam um maior potencial para a organogénese comparativamente aos explantes de origem *ex vitro*. Esta diferença pode dever-se ao diferente nível de reguladores de crescimento endógenos.

Finalmente, nos processos de organogénese e de embriogénese somática são utilizados explantes sem células meristemáticas pré-formadas como por exemplo folhas e entrenós de caules, promovendo-se a desdiferenciação prévia a nível celular para a reaquisição do estado meristemático primário. Já nos processos de rebentação axilar, os novos rebentos originam-se a partir do desenvolvimento de pontos meristemáticos pré-existent no explante inicial, sendo frequentemente utilizados como explantes fragmentos de caule com pelo menos um gomo axilar ou apical (segmentos nodais e apicais) (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011).

1.4.3.3. Estação do ano

A estação do ano é também um fator condicionante do sucesso da cultura *in vitro*, bem como da disponibilidade de material vegetal juvenil para o estabelecimento (Augé *et al.*, 1989; Yari *et al.*, 2014b). Normalmente, as estações mais frias e húmidas, outono e inverno, não são indicadas para fazer estabelecimentos *in vitro* devido às elevadas contaminações fúngicas do material vegetal nestas alturas. Adicionalmente, para contornar o problema da escassez de material vegetal juvenil, durante o outono e inverno é feita a indução da rebentação do material vegetal adulto mediante um tratamento de frio que se prolonga durante alguns meses até ao fim do inverno ou início da primavera. Nessa altura, é feita a sua rehidratação e aquecimento de forma a estimular a formação de novos rebentos (rebentos epicórmicos) que poderão ser usados em novos estabelecimentos *in vitro*.

1.4.3.4. Composição do meio de cultura

Uma das características que distingue as plantas de outros seres vivos é a autotrofia, ou seja, a capacidade de produzirem substâncias orgânicas a partir do CO_2 , da água e de nutrientes minerais na presença de luz, num processo denominado fotossíntese (Figura 4).

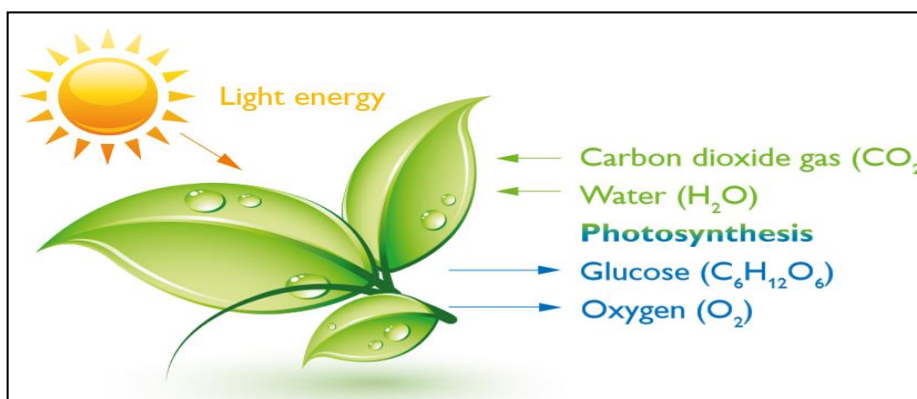


Fig.4 - A fotossíntese (Philips Horticulture LED Solutions, 2015).

Como as culturas *in vitro* consistem em culturas de porções de plantas (explantes), e os processos fotossintéticos ocorrem em órgão específicos, os cloroplastos, presentes sobretudo nas folhas, muitos dos explantes são incapazes ou ineficazes em sintetizar as substâncias orgânicas necessárias ao seu crescimento e desenvolvimento. Por esse motivo, é imperativo que estas substâncias lhes sejam fornecidas externamente através de um meio de cultura nutritivo (Pierik, 1997). Nesse sentido, os meios de cultura são constituídos por um conjunto de substâncias necessárias ao crescimento das plantas, nomeadamente, compostos inorgânicos (macronutrientes e micronutrientes) e compostos orgânicos como hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crescimento, agentes gelificantes no caso dos meios sólidos e outros aditivos (Augé *et al.*, 1989).

A composição do meio de cultura depende da espécie vegetal, do tipo de explante e da via de regeneração clonal pretendida (Iliev *et al.*, 2010). Existem vários meios de cultura adaptados para as diferentes espécies vegetais e por vezes, para os diferentes órgãos da planta. Os mais comuns são os meios de cultura Knudson (Knudson, 1946), MS (Murashige e Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), SH (Schenk e Hildebrandt, 1972), TK (Tabachnik e Kester, 1977), WPM (Woody Plant Medium, Lloyd e McCown, 1981), DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) e Rugini (Rugini, 1984).

O meio de cultura mais frequentemente utilizado na cultura *in vitro* é o meio MS, pois a grande maioria das plantas responde-lhe favoravelmente. O meio MS é um meio rico em sais minerais com elevados níveis de azoto (N), potássio (K) e de alguns micronutrientes como o boro (B) e o manganésio (Mn) (Quisen e Angelo, 2008). Apesar dos elevados níveis de sais minerais, o meio MS não é adequado para a propagação *in vitro* de algumas espécies. O meio de cultura, a sua concentração em sais minerais, bem como a possibilidade de combinação de componentes de diferentes meios de cultura são aspetos importantes e que podem conduzir à otimização do processo de cultura *in vitro*.

Para além de todos os componentes orgânicos e inorgânicos necessários, o meio de cultura tem de apresentar um pH específico que permita a correta absorção dos nutrientes pelos tecidos vegetais. Normalmente, o pH dos meios de cultura está compreendido entre 5.6 e 5.8 (Quisen e Angelo, 2008).

1.4.3.4.1. Macro e micronutrientes

Os principais macronutrientes presentes nos meios de cultura, requeridos pelas plantas em concentrações milimolares são o azoto (N), o potássio (K), o fósforo (P), o cálcio (Ca), o enxofre (S) e o magnésio (Mg). Normalmente, são absorvidos pelas

células vegetais na forma de catiões (Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^{+}). Contudo, o azoto é absorvido na forma de amónia (NH_4^{+}) ou nitrato (NO_3^{-}), o fósforo na forma de ião fosfato (HPO_4^{2-}) e o enxofre na forma de ião sulfato (SO_4^{2-}). A concentração ótima de cada macronutriente varia consideravelmente de acordo com a espécie vegetal, o tipo de explante, etc. Já os principais micronutrientes presentes nos meios de cultura, requeridos pelas plantas em concentrações micromolares, são o ferro (Fe), o manganésio (Mn), o zinco (Zn), o boro (B), o cobre (Cu), o molibdénio (Mo) e o sódio (Na) (Quisen e Angelo, 2008).

1.4.3.4.2. Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono constituem uma fonte de energia que suporta o metabolismo dos tecidos vegetais e mantém o potencial osmótico mínimo do meio de cultura. A fonte de hidratos de carbono mais frequentemente utilizada na cultura in vitro é a sacarose, sendo normalmente usada na concentração de 2% a 3% no meio de cultura. Este facto deve-se ao seu baixo custo, elevada disponibilidade, relativa estabilidade à esterilização em autoclave e rápida absorção pelas plantas. Contudo, existem outras alternativas como a glucose, a frutose, a lactose, a maltose, a galactose, o amido, o manitol, bem como os açúcares-álcoois glicerol e sorbitol (Quisen e Angelo, 2008).

1.4.3.4.3. Vitaminas

As plantas sintetizam naturalmente as vitaminas necessárias para o seu crescimento e desenvolvimento. No entanto, algumas vitaminas podem ser limitantes para o seu crescimento in vitro. As vitaminas mais frequentemente usadas na cultura in vitro são a tiamina (vitamina B1), o ácido nicotínico (niacina), a piridoxina (vitamina B6) e o mio-inositol, um hexitol, que também constitui uma fonte de carbono (Quisen e Angelo, 2008).

1.4.3.4.4. Aminoácidos e amidas

Os aminoácidos e as amidas apresentam também uma grande importância nas respostas morfogenéticas in vitro. Os principais aminoácidos usados na cultura in vitro são a tirosina, a L-arginina e a L-serina e as amidas mais usadas são a L-glutamina, a L-asparagina e a cisteína (Quisen e Angelo, 2008).

1.4.3.4.5. Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento (citocininas, auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, entre outros) são compostos orgânicos naturalmente sintetizados pelas plantas superiores, que influenciam fortemente o seu crescimento e desenvolvimento e consequentemente, condicionam a resposta dos explantes ao longo das diferentes fases da cultura *in vitro* (Augé *et al.*, 1989). O crescimento e a morfogénese *in vitro* são regulados pela interação e equilíbrio entre os reguladores de crescimento presentes no meio de cultura e também os reguladores de crescimento produzidos endogenamente pelos tecidos vegetais (Augé *et al.*, 1989; George, 1993).

Adicionalmente aos reguladores de crescimento, existem outros compostos com capacidade fitoreguladora como por exemplo, as oligossacarinas, as poliaminas, a fenilureia e as anti-auxinas (Augé *et al.*, 1989). Para além dos reguladores de crescimento naturais, alguns químicos sintéticos com atividades fisiológicas análogas a estes têm sido desenvolvidos (Pierik, 1997).

Os principais reguladores de crescimento usados na cultura *in vitro* são as auxinas e as citocininas.

1.4.3.4.5.1. Auxinas

Dos múltiplos efeitos fisiológicos das auxinas nas plantas destacam-se a promoção do alongamento celular, da divisão celular, o alongamento dos entrenós, o aumento da friabilidade do *callus*, a indução da embriogénese, a modificação da permeabilidade da membrana plasmática, a atividade no metabolismo em geral (intervenção na síntese de RNA ribossómico), a ação sobre as células cambiais, o aumento da concentração de etileno, a alteração do tropismo, a promoção da dominância apical, a intervenção na partenocarpia, na iniciação floral, o atraso dos fenómenos de abscisão foliar, a ação rizogénica (formação de raízes laterais e adventícias) e a inibição da formação de rebentos adventícios e axilares (Augé *et al.*, 1989; Pierik, 1997; Slater *et al.*, 2008).

A estrutura química básica das auxinas é bastante variável. Nas plantas, os compostos isolados com propriedades auxínicas são os ácidos indolil-3-acético (IAA), indolil-3-butírico (IBA) e fenilacético (PAA) (Slater *et al.*, 2008). Estes compostos são produzidos nos órgãos jovens da planta como folhas e flores jovens, gomos ativos, ápices caulinares e frutos jovens e o seu transporte na planta é basípeto (Augé *et al.*, 1989). Dentro do grupo das auxinas sintéticas encontram-se os ácidos 1-naftalenoacético (ANA), 2-naftiloxiacético (ANO), indolil-3-propílico (IPA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) (Slater *et al.*, 2008). Os ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), 2-metoxi-3,6-diclorobenzóico (Dicamba), 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) e 4-amino-

2,5,6-tricloropicolínico (Picloram) para além de propriedades auxínicas apresentam também toxicidade em algumas plantas, levando à inibição do alongamento celular, à promoção de anomalias no crescimento, à descoloração das folhas e à formação de tumores (Augé *et al.*, 1989; Slater *et al.*, 2008). No quadro seguinte, são apresentadas as principais auxinas usadas na cultura *in vitro*.

Quadro 4 - Principais auxinas usadas na cultura *in vitro* (Adaptado de Slater *et al.*, 2008).

Abreviatura/Designação	Designação Química
2,4-D ^{b,c}	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2,4,5-T ^{b,c}	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
Dicamba ^c	Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzóico
IAA ^a	Ácido indolil-3-acético
IBA ^a	Ácido indolil-3-butírico
MCPA ^c	Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético
NAA ^b	Ácido 1-naftalenacético
ANO ^b	Ácido 2-naftiloxiacético
Picloram ^c	Ácido 4-amino-2,5,6-tricloropicolínico
PAA ^a	Ácido fenilacético
IPA ^b	Ácido indolil-3-propílico

Legenda: a) Auxina natural; b) Análogo sintético e c) Herbicida com propriedades auxínicas.

1.4.3.4.5.2. Citocininas

Dos múltiplos efeitos fisiológicos das citocininas nas plantas destacam-se a promoção da divisão celular, da formação de gomos axilares e de rebentos adventícios, a promoção da síntese proteica, a mobilização de nutrientes, o atraso dos fenómenos de senescência de órgãos, a maturação dos cloroplastos, o antagonismo da dominância apical e do estado de dormência dos gomos e a manutenção das culturas *in vitro* por tempo indeterminado (Augé *et al.*, 1989; George, 1993; Sutter 1996; Slater *et al.*, 2008).

As citocininas são compostos derivados da base adenina (aminopurina) e a sua estrutura química básica consiste num anel de purina. Nas plantas, os compostos isolados com propriedades citocínicas são a N⁶-(2-isopentil)adenina (2iP ou IPA) e a 4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina ou Zeatina (Z) (Slater *et al.*, 2008). Estes compostos são produzidos nos órgãos jovens da planta como folhas jovens, gomos ativos, ápices radiculares e embriões (Augé *et al.*, 1989). Dentro do grupo das citocininas sintéticas encontram-se a 6-benzilaminopurina (BAP), a 6-

furfurilaminopurina ou Cinetina (K), a N-(2-cloro-4-piridil)-N'-fenilureia (CPPU) e a 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)-ureia ou Tidiazuron (TDZ) (Slater et al., 2008). As citocininas constituem, sob o ponto de vista da cultura *in vitro*, um elemento muito importante na multiplicação vegetativa. No quadro seguinte, são apresentadas as principais citocininas usadas na cultura *in vitro*.

Quadro 5 - Principais citocininas usadas na cultura *in vitro* (Adaptado de Slater et al., 2008).

Abreviatura/Designação	Designação Química
2iP (IPA) ^a	N6-(2-isopentil)adenina
Zeatina (Z) ^a	4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina
Cinetina (K) ^b	6-furfurilaminopurina
BAP ^b	6-benzilaminopurina
Tidiazuron (TDZ) ^{b,c}	1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)-ureia
CPPU ^{b,c}	N-(2-cloro-4-piridil)-N'-fenilureia

Legenda: a) Citocinina natural; b) Análogo sintético e c) Citocinina do tipo fenilureia substituída.

Segundo Augé et al. (1989) e Slater et al. (2008), nenhum regulador de crescimento é, por si só, responsável por determinado efeito fisiológico nas plantas. A divisão das células vegetais requer tanto a presença de auxinas como de citocininas, e embora as citocininas tenham um efeito mais relevante na indução da divisão celular, são menos eficazes na ausência de auxinas (George, 1993). Adicionalmente, o efeito destes reguladores de crescimento na divisão celular varia com a substância em questão, a sua concentração e o estágio de diferenciação celular dos tecidos vegetais.

Em 1957, Skoog e Miller determinaram que a formação de rebentos a partir de *callus* de tabaco podia ser feita usando níveis relativamente baixos de auxina e níveis relativamente elevados de citocinina no meio de cultura, dando a entender que os processos de diferenciação celular e organogénese eram controlados pela razão auxina:citocinina (Dodds e Roberts, 1986). O esquema proposto por Skoog e Miller (1957) da possibilidade de regulação do desenvolvimento das plantas através da alteração da razão auxina:citocinina no meio de cultura verifica-se na maioria das espécies (Figura 5). De acordo com a razão existente entre estes dois reguladores de crescimento no meio de cultura podem ocorrer três situações principais. Se a razão auxina:citocinina for bastante superior a 1 ocorre a formação de raízes (rizogénese); se a razão auxina:citocinina for bastante inferior a 1 ocorre a proliferação e o desenvolvimento de rebentos; e finalmente, se a razão auxina:citocinina for próxima de 1 ocorre a formação de *callus* (Taiz e Zeiger, 1991; Slater et al., 2008). Contudo, a razão auxina:citocinina no meio de cultura nem sempre conduz aos resultados

apresentados no esquema seguinte, variando o tipo de resposta morfogênética com a espécie vegetal, as condições de cultura e os restantes compostos presentes no meio. Os reguladores de crescimento mais utilizados para promover o crescimento *in vitro* são as citocininas BAP, K, 2iP e Z, individualmente ou em combinação com as auxinas IAA, IBA, NAA e 2,4-D (Pierik, 1997).

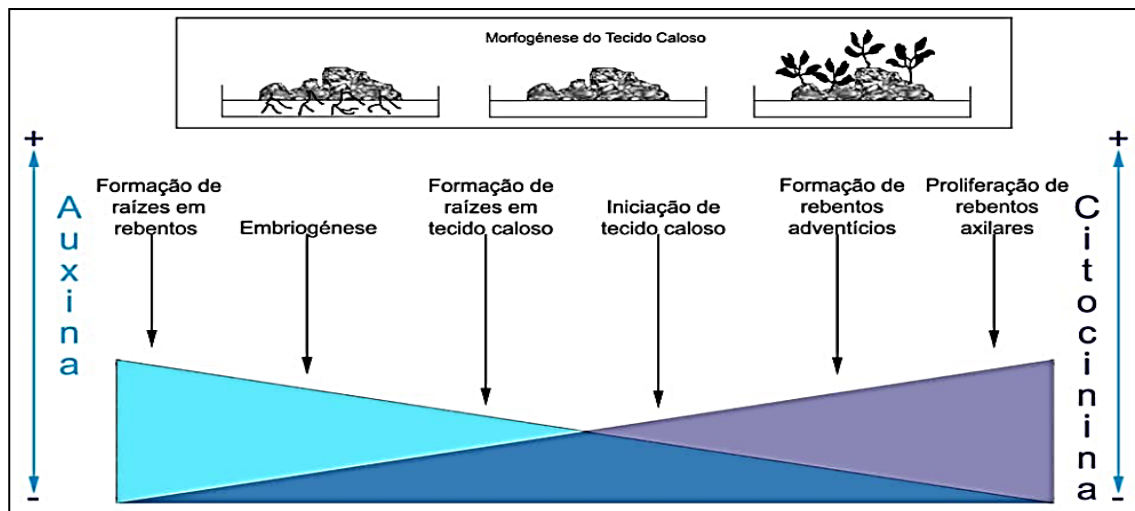


Fig.5 - Efeito da razão entre a concentração de auxina e citocinina no meio de cultura nas respostas morfogênicas obtidas *in vitro* (Adaptado de Slater *et al.*, 2008).

1.4.3.4.6. Agentes gelificantes

Os agentes gelificantes têm como função dar consistência ao meio de cultura, de modo a conferir suporte às plantas. Os agentes gelificantes mais comumente usados na cultura *in vitro* são o agar, a gelrite, a agarose e o amido (Quisen e Angelo, 2008; Kumar e Reddy, 2011). O agar, um polissacarídeo extraído de algas vermelhas, é o agente gelificante tradicionalmente utilizado nos meios de cultura (Kumar e Reddy, 2011). A gelrite, um hetero-polissacarídeo produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea*, constitui uma atraente alternativa ao agar e produz um gel claro que facilita a observação adequada das culturas e de possíveis contaminações (George, 1993).

Paques (1991) apontou a existência de uma forte relação entre a concentração do agente gelificante no meio de cultura, a taxa de multiplicação dos rebentos e a ocorrência de sintomas de vitrificação dos tecidos vegetais. Segundo Zimmerman (1995), normalmente os meios de cultura com uma maior concentração de agar apresentam uma menor ocorrência de sintomas vitrificação dos tecidos vegetais. Contudo, a taxa de multiplicação dos rebentos pode ser drasticamente reduzida e consequentemente, a eficiência da propagação *in vitro*. Adicionalmente, a concentração do agente gelificante no meio de cultura pode afetar a rizogénese e portanto, a taxa de enraizamento obtida (Debergh, 2000).

1.4.3.5. Condições ambientais

O sucesso da cultura *in vitro* é altamente influenciado pelas condições ambientais fornecidas aos explantes (Read e Preece, 2003; Kumar e Reddy, 2011; Nezami *et al.*, 2014), nomeadamente as condições de fotoperíodo, humidade e temperatura.

1.4.3.5.1. Humidade

Os recipientes de cultura são normalmente sistemas fechados, contudo, não hermeticamente, de modo a permitirem algumas trocas gasosas com o exterior. Os recipientes de cultura, apesar de fechados, devem permitir a suficiente ventilação dos explantes, de forma a prevenir a acumulação significativa de etileno, permitir a entrada de CO₂ essencial para o processo da fotossíntese e evitar a excessiva acumulação de vapor de água resultante deste processo, da respiração e transpiração dos tecidos vegetais. Geralmente, a humidade relativa do ar no interior dos recipientes de cultura ronda os 98% (Altman, 2000). Humidades relativas do ar superiores afetam negativamente o normal crescimento e desenvolvimento dos explantes *in vitro*, conduzindo frequentemente à vitrificação dos tecidos em cultura. Para além disso, as plântulas que se desenvolvem *in vitro* nestas condições apresentam normalmente maiores taxas de respiração e anormalidades anatómicas *ex vitro*, o que pode resultar numa elevada taxa de mortalidade durante o processo de aclimatização (Kumar e Reddy, 2011).

1.4.3.5.2. Luz

A luz influencia fortemente o crescimento e desenvolvimento das plantas, uma vez que regula processos fisiológicos vitais como a fotossíntese, o fototropismo e a morfogénese (Read e Preece, 2003; Kumar e Reddy, 2011).

As três características da luz que mais influenciam o crescimento *in vitro* são a qualidade da luz ou espectro luminoso que se caracteriza pela gama de comprimentos de onda (cores) da radiação; a intensidade luminosa que se caracteriza pelo número total de fotões que a planta absorve (radiação de crescimento) na região da radiação fotossinteticamente ativa (região PAR do inglês *Photosynthetically Active Radiation*); e o fotoperíodo que consiste no número de horas de luz face ao número de horas de escuro (George, 1993; Kumar e Reddy, 2011; Philips Horticulture LED Solutions, 2015) A otimização destes três fatores deve ser feita de acordo com a espécie vegetal e o genótipo da planta.

De todo o espectro visível (comprimento de onda) da radiação, apenas a radiação compreendida entre os comprimentos de onda de 400 nm a 700 nm é utilizada pela planta para a realização do processo fotossintético. Esta radiação é chamada de radiação PAR (do inglês *Photosynthetically Active Radiation*). Os fótons que correspondem a radiação PAR são chamados de radiação de crescimento. Apenas 45% da radiação total corresponde a radiação PAR (Philips Horticulture LED Solutions, 2015). Assim, as lâmpadas que compõem o sistema de iluminação artificial adotado pelos laboratórios de cultura *in vitro* devem converter o máximo de energia elétrica em radiação (energia) PAR (Philips Horticulture LED Solutions, 2015) (Figura 6).

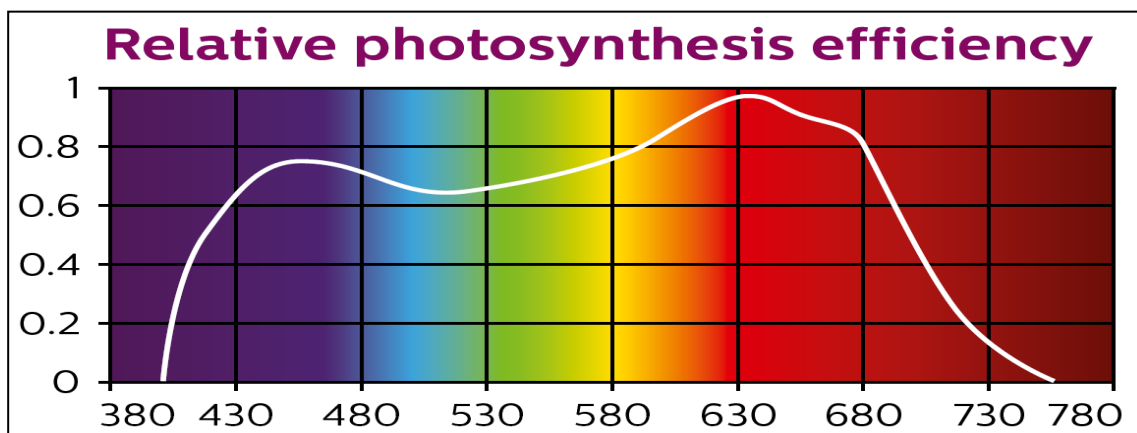


Fig.6 - Eficiência relativa da fotossíntese em função do comprimento de onda da radiação absorvida (Philips Horticulture LED Solutions, 2015).

O sistema de iluminação artificial frequentemente adotado pelos laboratórios de cultura *in vitro* é composto por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Contudo, o sistema de iluminação LED (do inglês *light-emitting diodes*) demonstra cada vez mais ser uma alternativa bastante viável (Figura 7). A iluminação LED é mais eficiente e versátil comparativamente às tradicionais lâmpadas fluorescentes em termos de espectro de radiação, intensidade luminosa e fotoperíodo. Este sistema permite ainda que sejam feitas combinações de diferentes espectros de radiação, intensidades luminosas e fotoperíodos no mesmo sistema LED. Finalmente, a utilização de iluminação LED em detrimento das lâmpadas fluorescentes contribui para um decréscimo acentuado do consumo energético e do aquecimento da sala de crescimento devido ao sobreaquecimento das lâmpadas (Philips Horticulture LED Solutions, 2015).

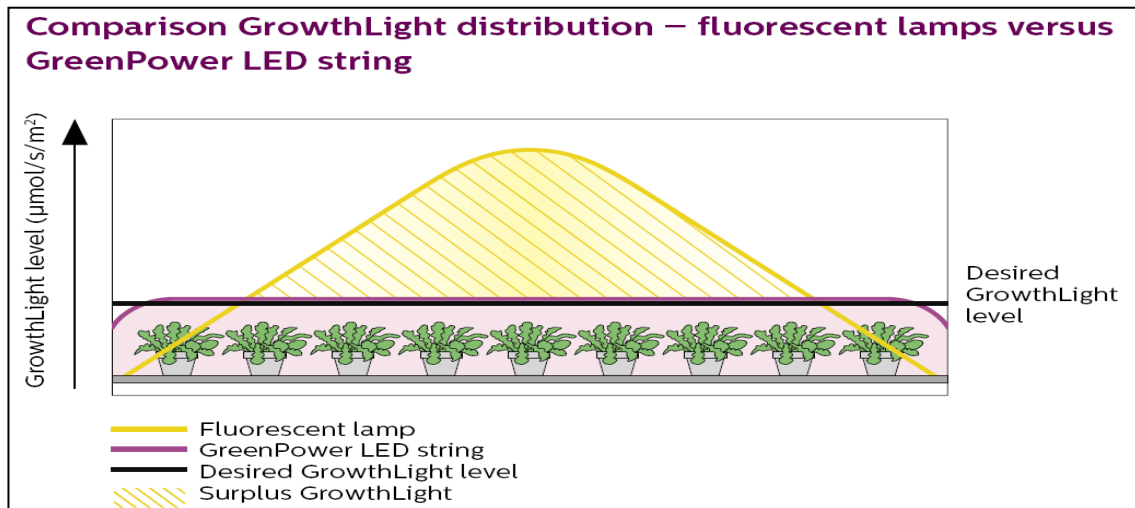


Fig.7 - Comparação da distribuição da intensidade luminosa entre as lâmpadas fluorescentes e as lâmpadas LED (Philips Horticulture LED Solutions, 2015).

De um modo geral, a iluminação LED resulta num aumento da taxa de multiplicação dos rebentos, numa melhoria e num maior controlo do processo de alongamento, numa maior qualidade do enraizamento, numa maior taxa de sobrevivência durante o enraizamento, no aceleração da fase de “endurecimento”, numa maior taxa de sobrevivência durante a fase de aclimatização e finalmente, no encurtamento do ciclo de crescimento das plantas (Philips Horticulture LED Solutions, 2015). Contudo, os diferentes comprimentos de onda ou cores da radiação de crescimento conduzem a respostas fisiológicas distintas das plantas. Por exemplo, o LED Azul apresenta um efeito positivo no “endurecimento” das plântulas *in vitro*, o LED vermelho profundo (do inglês *deep red*) é o mais eficiente para a fotossíntese, propagação vegetativa e para a proliferação e desenvolvimento de rebentos e o LED vermelho longínquo (do inglês *far red*) apresenta um efeito positivo na regeneração vegetativa, na floração e no enraizamento. Finalmente, o LED branco apresenta a totalidade do espectro de radiação (Philips Horticulture LED Solutions, 2015).

1.4.3.5.3. Temperatura

A temperatura também influencia o crescimento *in vitro* das plantas, pois regula vários processos fisiológicos essenciais como a fotossíntese, a respiração e a transpiração. As temperaturas mais comumente utilizadas na cultura *in vitro* variam entre os 20°C e 27°C, contudo, a temperatura ótima depende da espécie vegetal e do genótipo da planta (Altman, 2000; Read e Preece, 2003; Kumar e Reddy, 2011).

1.4.4. Fases da cultura *in vitro*

De um modo geral, o processo de propagação *in vitro* divide-se em quatro fases principais: estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização.

1.4.4.1. Estabelecimento *in vitro*

Na fase de estabelecimento *in vitro*, a planta-mãe depois de selecionada de acordo com as características desejadas é submetida a diversos testes de qualidade e tratamentos químicos de desinfecção de forma a garantir a sua qualidade fitossanitária, fulcral para o sucesso do processo de cultura *in vitro* (Carlos, 2014).

Após a escolha do tipo de explante inicial e a sua recolha da planta-mãe, é necessário fazer a sua desinfecção química (Iliev *et al.*, 2010). A desinfecção dos explantes tem como objetivo eliminar os microrganismos presentes na sua superfície, tais como bactérias e fungos, com a indução do mínimo de danos possível no material vegetal. Na literatura são apresentados diversos métodos de desinfecção de acordo com a espécie e o tipo de explante. O hipoclorito de cálcio ou sódio é o agente desinfetante mais frequentemente usado na desinfecção dos explantes. Normalmente, apresenta uma concentração de 4% a 8% de cloro ativo e como não penetra praticamente nos tecidos permite que estes se desenvolvam *in vitro*. Contudo, é pouco estável em solução aquosa e portanto, tem de ser preparado no momento do uso. Outro agente desinfetante, o bicloreto de mercúrio, utilizado comumente na concentração de 0,01% a 0,05%, é também muito eficaz na desinfecção dos explantes. Contudo, é mais difícil de eliminar dos tecidos vegetais e alguns estudos apontam que seja altamente carcinogénico. O mercurobutol é igualmente um excelente desinfetante pois contém um detergente que aumenta o seu poder de penetração nos tecidos vegetais e eficácia de desinfecção. Todavia, é igualmente difícil de eliminar dos tecidos vegetais (Augé *et al.*, 1989; Yari *et al.*, 2014b).

Quando se utilizam, em combinação com o agente desinfetante, detergentes com agentes tensioativos que aumentam a capacidade de fixação do agente desinfetante às superfícies vegetais, é vulgar utilizar-se Tween20 na concentração de 0,01 ml/l. Deve no entanto salientar-se, que a desinfecção do material vegetal é realizada superficialmente, e por isso, se os tecidos vegetais apresentarem contaminações endógenas, não é possível fazer a sua desinfecção (Lopes, 2011).

O sucesso da fase de estabelecimento *in vitro* depende do compromisso entre uma adequada desinfecção do material vegetal e uma boa taxa de sobrevivência dos explantes. Obter este compromisso é um processo lento e delicado pois o grau de contaminação das superfícies dos tecidos vegetais é muito variável (Carlos, 2014). Assim, para cada espécie, tipo, idade e estado fitossanitário dos explantes devem ser

testados diferentes agentes desinfetantes, várias concentrações e diferentes tempos de contacto (Carlos, 2014), de forma a chegar-se ao método de desinfecção mais apropriado. Quanto mais jovem e saudável for o material vegetal, menos agressivo deve ser o método de desinfecção utilizado e vice-versa.

Após a desinfecção, os explantes são inoculados em meio de cultura adequado, em condições de assepsia. De seguida, são colocados numa câmara de cultura (ou sala de crescimento) com condições de luz, temperatura e humidade controladas. A orientação com que o explante é inoculado no meio de cultura também afeta a eficiência da regeneração *in vitro* (Kumar e Reddy, 2011). Geralmente, a eficiência da regeneração é mais elevada quando o explante é colocado na posição horizontal ao meio de cultura comparativamente a quando se encontra na posição vertical, devido à maior área de contacto entre a superfície do explante e o meio de cultura. O local de iniciação, a polaridade e a eficiência da regeneração alteram-se também de acordo com a orientação do explante no meio de cultura.

Na maioria das espécies, a fase de estabelecimento *in vitro* completa-se em quatro a seis semanas (Hartmann *et al.*, 2010).

1.4.4.2. Multiplicação *in vitro*

Após o estabelecimento da cultura *in vitro* em condições asépticas, segue-se a fase de multiplicação. A fase de multiplicação *in vitro* caracteriza-se pela rápida regeneração e multiplicação dos rebentos obtidos na fase anterior (Kumar e Reddy, 2011). Durante esta fase, cada rebento colocado em meio de cultura expande-se num *cluster* de pequenos rebentos. Após a obtenção de uma elevada taxa de multiplicação dos rebentos, quando estes atingem um tamanho adequado são separados e utilizados nas fases da propagação *in vitro* seguintes para darem origem a novas plantas ou como material vegetal stock do laboratório permanecendo nesta fase (Hartmann *et al.*, 2010; Kumar e Reddy, 2011).

A viabilidade dos processos de propagação *in vitro* depende fortemente das taxas de multiplicação conseguidas, pois estes só são comercialmente competitivos se forem obtidas elevadas taxas de multiplicação, uma vez que o processo requer um grande investimento em equipamento, mão-de-obra e energia (Carlos, 2014). Inúmeros fatores endógenos e exógenos podem limitar as taxas de multiplicação obtidas tais como o genótipo da planta (Scaltsoyiannes *et al.*, 1997; Kumar e Reddy, 2011; Carlos 2014; Nezami *et al.*, 2014), a composição mineral do meio de cultura, a fonte de hidratos de carbono, o tipo e concentração dos reguladores de crescimento, a concentração do agente gelificante (Kumar e Reddy, 2011; Yari *et al.*, 2014a; Nezami

et al., 2014), a humidade relativa do ar, a luz e a temperatura fornecidas (Read e Preece, 2003; Kumar e Reddy, 2011; Nezami *et al.*, 2014).

Na fase de multiplicação *in vitro*, as citocininas são os reguladores de crescimento que mais influenciam as respostas morfológicas obtidas, promovendo a proliferação e o desenvolvimento de novos rebentos. De um modo geral, os novos rebentos devem ser subcultivados a cada duas a oito semanas (Iliev *et al.*, 2010). Regularmente, é usado o mesmo meio de cultura durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro*.

1.4.4.3. Enraizamento *in vitro*

Uma vez conseguida uma elevada taxa de multiplicação, segue-se a fase de enraizamento dos rebentos. Características dos rebentos como um bom alongamento, diâmetro do caule, desenvolvimento foliar e número médio de gomos desenvolvidos durante a fase de multiplicação *in vitro*, estão fortemente correlacionadas com a posterior taxa de enraizamento obtida (Carlos, 2014).

A maior parte das espécies lenhosas são espécies de difícil enraizamento, pelo que os meios de cultura usados durante esta fase diferem dos utilizados na fase de multiplicação, principalmente na sua composição em macronutrientes. É vulgar utilizar-se nesta fase um meio de cultura com uma concentração iónica mais baixa, ou então, optar-se pela utilização do mesmo meio de cultura usado na multiplicação, contudo, com redução da concentração dos macronutrientes para $\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ e suplementado com auxinas para a promoção da rizogénese (Carlos, 2014).

A fase de enraizamento pode ser dividida em duas subfases, as subfases de indução e expressão radicular. Na subfase de indução radicular ocorre a indução da formação dos primórdios radiculares e durante a subfase de expressão radicular dá-se o desenvolvimento dos primórdios radiculares neoformados em raízes. De um modo geral, este processo pode ser conduzido *in vitro* em condições próximas daquelas em que decorreu a subfase de indução radicular ou *ex vitro* em condições próximas daquelas que a plântula vai encontrar durante a fase de aclimatização. A escolha do enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* tem que ver com a resposta das diferentes espécies vegetais à presença de auxinas no meio de cultura após a subfase de indução radicular e à sua maior ou menor sensibilidade a mudanças mais ou menos drásticas nas condições de desenvolvimento, como o tipo de substrato e a humidade relativa do ar (Carlos, 2014).

1.4.4.4. Aclimatização *ex vitro*

Finalmente, tem lugar a última fase do processo de propagação *in vitro*, a fase de aclimatização. A aclimatização consiste num processo de adaptação gradual das plântulas produzidas *in vitro* às condições climáticas e ambientais naturais e a sua transição da condição heterotrófica para a condição autotrófica (Hartmann *et al.*, 2010; Carlos, 2014). Para isso, as plântulas produzidas *in vitro* são inicialmente transferidas para um substrato e colocadas numa estufa com luz, temperatura e humidade controladas, relativamente similares às fornecidas *in vitro* mas que ao longo do tempo vão sendo progressivamente ajustadas às condições ambientais naturais de forma a facilitar posteriormente a passagem das plantas para as condições de campo (Rohr *et al.*, 2003).

De forma a evitar contaminações microbianas, o meio de cultura deve ser cuidadosamente removido das raízes das plântulas antes da sua colocação em substrato (Murai *et al.*, 1997). A composição do substrato é um aspeto também bastante importante pois pode levar a alterações significativas nas taxas de sobrevivência *ex vitro* das plântulas (George e Sherrington, 1984). Normalmente, são usados como substrato vermiculite, turfa e perlite, isoladamente ou em misturas com diferentes proporções.

De um modo geral, as folhas das plântulas produzidas *in vitro* apresentam um fraco desenvolvimento da cutícula e uma baixa quantidade de ceras epicuticulares (Alanagh *et al.*, 2010), pelo que é muito importante durante esta fase diminuir ao máximo a desidratação dos tecidos vegetais, associada frequentemente com uma elevada taxa de mortalidade (Conger, 1981; Hartmann *et al.*, 2010; Preece, 2010). Para isso, é normalmente usado na estufa um sistema de brumização que regula e fornece uma humidade adequada, que durante esta fase é gradualmente reduzida até mimetizar as condições naturais. As plantas transferidas das condições *in vitro* para *ex vitro* sofrem modificações graduais na sua anatomia e morfologia foliares (Iliev *et al.*, 2010).

Outros factores como a resistência ou a suscetibilidade a doenças e a qualidade do sistema radicular formado podem também influenciar a capacidade de aclimatização das plântulas (Paygahzadeh e Kazemitabar, 2011).

1.5. Propagação *in vitro* dos porta-enxertos GF677 e Vlach

1.5.1. Propagação *in vitro* de GF677

As principais dificuldades na propagação *in vitro* das espécies do género *Prunus* e consequentemente do porta-enxertos GF677 incluem a elevada oxidação dos explantes estabelecidos *in vitro*, as elevadas taxas de contaminação por bactérias e

fungos, as baixas taxas de multiplicação, o surgimento de rebentos pequenos e com o formato de “roseta” (alargamento exagerado das folhas), a vitrificação, a clorose e a necrose dos rebentos e as baixas taxas de enraizamento (George, 1993; Dimassi e Economou, 1995; Murai *et al.*, 1997; Perez-Tornero *et al.*, 2000; Couto, 2003; Tsipouridis e Thomidis, 2003; Alanagh *et al.*, 2010; Aghaye e Yadollahi, 2012; Sepahvand *et al.*, 2012).

Segundo Sharifmoghaddam *et al.* (2011), o outono é a estação do ano mais adequada à recolha e estabelecimento *in vitro* dos explantes de GF677. A propagação *in vitro* deste porta-enxertos é usualmente baseada nos meios de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), WPM (Woody Plant Medium, Lloyd e McCown, 1981) e GNH (Alanagh *et al.*, 2010). De acordo com Nezami *et al.* (2014), o problema da vitrificação e necrose dos tecidos de GF677 em cultura podem ser resolvidos com a utilização do meio GNH (Alanagh *et al.*, 2010), um derivado do meio MS.

Segundo alguns autores (Tsipouridis e Thomidis, 2003; Aghaye e Yadollahi, 2012; Sepahvand *et al.*, 2012), durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de GF677 em meio MS observa-se frequentemente o surgimento de rebentos pequenos e com o formato de “roseta”, devido às elevadas fontes de carbono presentes neste meio de cultura. Tsipouridis *et al.* (2003) e Kas *et al.* (2004) (citado em Sepahvand *et al.*, 2012) compararam diferentes meios de cultura para a propagação *in vitro* de GF677, tendo concluído que o meio ½ MS e Knop eram meios de cultura mais adequados comparativamente ao meio MS, pois nestes surgiam rebentos com um crescimento normal. Já Aghaye e Yadollahi (2012) e Sepahvand *et al.* (2012) recomendavam o uso do meio MS para a propagação *in vitro* de GF677, referindo que o crescimento anormal dos rebentos estava associado com a elevada concentração de mio-inositol (vitamina e fonte de carbono) neste meio (100 mg/l). Sepahvand *et al.* (2012) avaliaram os efeitos da redução da concentração de mio-inositol no meio MS na formação de rebentos com crescimento anormal, durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de GF677. Estes autores determinaram que a redução da concentração de mio-inositol de 100 mg/l para 10 mg/l no meio MS, conduzia ao surgimento de rebentos normais e com um maior comprimento médio (4,6 cm).

A citocinina BAP é comumente usada na propagação *in vitro* dos híbridos entre o pessegueiro e a amendoeira (*Prunus persica* x *Prunus dulcis*) (Fotopoulos e Sotiropoulos, 2005). Na propagação *in vitro* de GF677, o BAP é frequentemente utilizado entre as concentrações de 0,1 e 3 mg/l (Ahmad *et al.*, 2003; Aghaye e Yadollahi, 2012). Ahmad *et al.* (2003) determinaram que a concentração de BAP que conduzia a um maior número e comprimento médios dos rebentos durante as fases de

estabelecimento e multiplicação *in vitro* era de 0,6 mg/l. Já Sepahvand *et al.* (2012) apontavam como melhor concentração de BAP 0,1 mg/l e Aghaye e Yadollahi (2012) indicavam 1 mg/l. Segundo Aghaye e Yadollahi (2012), as concentrações de BAP superiores a 1 mg/l provocavam a redução no número de rebentos por explante e levavam à formação de uma grande quantidade de *callus*. Esta disparidade nas concentrações indicadas de BAP pode, provavelmente, dever-se ao diferente grau de pureza da citocinina usada em cada laboratório.

Finalmente, segundo Alanagh *et al.* (2010), o maior número de rebentos normais de GF677 foi obtido com o meio GNH suplementado com BAP na concentração de 0,5 mg/l e IBA na concentração de 0,1 mg/l. De acordo com Sharifmoghammad *et al.* (2011), o meio mais adequado para a fase de multiplicação *in vitro* de GF677 foi o meio MS suplementado com BAP na concentração de 2 mg/l e IBA na concentração de 0,01 mg/l, tendo obtido uma taxa de multiplicação média dos rebentos de GF677 de 3,15 (3,15 rebentos por explante), após quatro semanas de cultura. Já Isikalan *et al.* (2008), reportaram ter obtido uma taxa de multiplicação média dos rebentos de 5,7 (5,7 rebentos por explante) com o meio MS suplementado com BAP na concentração de 2 mg/l.

Segundo vários autores (Caboni *et al.*, 1997; Bellamine *et al.*, 1998; De Klerk *et al.*, 1999; Fotopoulos e Sotiropoulos, 2005), as auxinas apresentam um papel positivo no enraizamento durante a subfase de indução radicular da fase de enraizamento, contudo, o seu contacto prolongado com os rebentos pode inibir o posterior desenvolvimento radicular durante a subfase de expressão radicular nas espécies do género *Prunus*. O IBA é a auxina que mais eficazmente promove a formação de raízes adventícias em GF677 (Spethmann e Hamzah, 1988; Riov, 1993; De Klerk *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 2004; Alanagh *et al.*, 2010). Isto pode dever-se ao facto do IBA ser mais estável e menos sensível à foto-oxidação (Riov, 1993; Caboni *et al.*, 1997; Nag *et al.*, 2001). Vaez-Livari e Salehi-Soghadi (2005) recomendavam a utilização de IBA na concentração de 5 mg/l para a indução do enraizamento em GF677. Já Sharifmoghammad *et al.* (2011) melhores resultados de enraizamento com a adição ao meio MS de IBA na concentração de 0,5 mg/l. Mais recentemente, Aghaye e Yadollahi (2012) indicavam que o enraizamento de GF677 era favorecido pela adição ao meio ½ MS de IBA na concentração de 3 mg/l, conduzindo à maior taxa de enraizamento (44%), bem como ao maior número (2,2 raízes por explante) e comprimento médios das raízes formadas (11,2 cm). Estes autores avaliaram também o efeito do uso isolado e em combinação de diferentes auxinas (IBA, NAA e IAA) no enraizamento de GF677, tendo concluído que o efeito do IBA era potenciado quando esta auxina era adicionada ao meio de enraizamento isoladamente, resultando numa maior taxa de

enraizamento e num maior comprimento médio das raízes formadas. Segundo Aghaye e Yadollahi (2012), estes resultados podem dever-se à ocorrência de reações químicas entre as diferentes auxinas adicionadas ao meio de cultura, resultando numa menor taxa de enraizamento. De acordo com Alanagh *et al.* (2010), a maior taxa de enraizamento (44%) foi obtida em meio GNH suplementado com IBA na concentração de 2 mg/l.

Sepahvand *et al.* (2012) avaliaram o efeito da vitamina tiamina em meio LS (Linsmaier e Skoog, 1965) no enraizamento de GF677. Estes autores determinaram que a tiamina favorecia significativamente o enraizamento e que a taxa de enraizamento mais baixa se verificava em meio LS sem tiamina. Já a maior taxa de enraizamento (100%) foi obtida em meio LS suplementado com tiamina na concentração de 1,6 mg/l e IBA na concentração de 1,3 mg/l.

Antonopoulou *et al.* (2004) avaliaram o efeito do Fe-EDDHA e do ácido ascórbico no enraizamento de GF677. Estes autores concluíram que a adição ao meio MS de Fe-EDDHA na concentração de 280 mg/l conduzia à maior taxa de enraizamento e ao maior comprimento médio das raízes formadas. Já a adição de ácido ascórbico não apresentou um efeito significativo no enraizamento de GF677. Sepahvand *et al.* (2012) também propunham a adição ao meio LS de Fe-EDDHA na concentração de 100 mg/l e Aghaye e Yadollahi (2012) recomendavam a adição ao meio ½ MS de Fe-EDDHA na concentração de 200 mg/l.

Segundo vários autores (Caboni *et al.*, 1997; Kamali *et al.*, 2001; Channuntapipat *et al.*, 2003; Antonopoulou *et al.*, 2004; Vaez-Livari e Salehi-Soghadi, 2005; Aghaye e Yadollahi, 2012), fatores como o fotoperíodo, a intensidade luminosa e a qualidade da luz (comprimento de onda) também afetam o enraizamento de GF677. Segundo estes autores, a manutenção dos rebentos de GF677 em meio de enraizamento no escuro durante um período curto (subfase de indução radicular) e a sua posterior transferência para a luz favorecia o seu enraizamento (subfase de expressão radicular), refletindo-se em taxas de enraizamento mais elevadas e num maior número e comprimento médios das raízes formadas. A condição de escuro essencial para a indução da rizogénese pode também ser mimetizada pela adição de carvão ativado ao meio de enraizamento (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011).

Relativamente à fase de aclimatização *ex vitro*, segundo Alanagh *et al.* (2010) e Nezami *et al.* (2014) após a lavagem com água corrente das raízes das plântulas para a remoção do meio de cultura, estas deviam ser colocadas em tabuleiro alveolar com uma mistura de turfa e perlite na proporção de 1:3 (v/v), cobertas com uma tela de polietileno transparente (1 semana) e incubadas numa câmara de cultura com humidade relativa de 96%, fotoperíodo de 16/8 horas, intensidade luminosa de 60

$\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. A humidade da câmara de cultura devia ser gradualmente reduzida até 60% e as plântulas regadas semanalmente. Após quatro a cinco semanas, as plântulas deviam ser transferidas para as condições de estufa. Após 2 meses, tanto Alanagh *et al.* (2010) como Nezami *et al.* (2014) obtiveram taxas de aclimatização *ex vitro* de 90% e as plântulas de GF677 tinham entre 20 a 30 cm e 15 a 25 cm de altura, respetivamente.

1.5.2. Propagação *in vitro* de Vlach

As principais dificuldades na propagação *in vitro* de *J. regia* e consequentemente do porta-enxertos Vlach incluem as elevadas contaminações microbianas endógenas dos explantes, a grande exsudação de compostos fenólicos, as baixas taxas de multiplicação nas primeiras subculturas e as baixas taxas de enraizamento e de aclimatização das plântulas (Claudot *et al.*, 1992; Ripetti *et al.*, 1994; Chenevard *et al.*, 1995; Saadat e Hennerty, 2001; Leal *et al.*, 2007; Peixe *et al.*, 2016).

Segundo Bourrain (2009), a Primavera (março e maio) é a estação do ano mais adequada à recolha e estabelecimento *in vitro* de explantes de *J. regia*. As elevadas contaminações microbianas endógenas e a grande exsudação de compostos fenólicos pelos explantes de *J. regia* podem ser atenuadas através da utilização de material vegetal regenerado por podas consecutivas ou macroenxertia, de forma a obter ápices caulinares com elevadas taxas de crescimento (Claudot *et al.*, 1992; Leslie e McGranahan, 1992) e pela utilização de antioxidantes no processo de desinfeção dos explantes e/ou a sua adição ao meio de cultura (Yari *et al.*, 2014a; Kepenek e Kolağasi, 2016). Os ápices caulinares de crescimento anual (Leslie e McGranahan, 1992), os meristemas (Meynier, 1984) e os ápices de rebentos epicórmicos parecem constituir as melhores alternativas para a introdução *in vitro* de explantes de *J. regia* (Heile-Sudholt *et al.*, 1986). Contudo, a propagação *in vitro* de *J. regia* e dos híbridos Paradox pode também ser iniciada a partir de embriões zigóticos, rebentos e segmentos nodais obtidos da planta-mãe (McGranahan e Leslie, 1988; Leslie e McGranahan, 1992).

Relativamente à formulação mineral do meio de cultura, vários meios foram utilizados na propagação *in vitro* de *J. regia* tais como o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), WPM (Woody Plant Medium, Lloyd e McCown, 1981) e DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) (Paygahzadeh e Kazemitabar, 2011; Yari *et al.*, 2014a). Desde 1984, que o meio DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) é frequentemente utilizado para a propagação *in vitro* de *J. regia*. Este meio foi inicialmente desenvolvido para os híbridos Paradox mas, de um modo geral, conduz a uma boa resposta na maioria das

Juglandaceas (Driver e Kuniyuki, 1984; Heile-Sudholt *et al.*, 1986; McGranahan e Leslie, 1988; Leslie e McGranahan, 1992; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Carlos, 2014). Segundo Saadat e Hennerty (2002) e Yari *et al.* (2014a), o meio DKW é o mais apropriado, pois estas espécies necessitam de um elevado nível de azoto durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro*. O meio DKW apresenta uma elevada concentração iónica de azoto semelhante à do meio MS, mas também altas concentrações de outros iões ausentes na formulação MS (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011). Contrariamente, o meio WPM frequentemente utilizado na propagação *in vitro* de espécies lenhosas, não é adequado para *J. regia* pois apresenta uma baixa concentração iónica (Driver e Kuniyuki, 1984; Saadat e Hennerty, 2002; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Yari *et al.*, 2014a). Apesar do meio DKW ser o mais adequado à propagação *in vitro* de *J. regia*, Saadat e Hennerty (2002) não observaram diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas de multiplicação obtidas com este meio e o meio MS (2,70 rebentos por explante). Adicionalmente, vários outros autores obtiveram sucesso na propagação *in vitro* de *J. regia* utilizando o meio MS (Cossio e Minotta, 1983; Penuela *et al.*, 1988; Revilla *et al.*, 1989; Gruselle e Boxus, 1990; Fatima *et al.*, 2006). Contudo, segundo Navatel e Bourrain (2001) apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas ao nível das taxas de multiplicação obtidas, com o meio DKW eram obtidos rebentos com um maior diâmetro e mais homogéneos.

Relativamente à fonte de hidratos de carbono, segundo Marques e Dias (2001) e Lopes (2011) a sacarose constitui o hidrato de carbono mais adequado à propagação *in vitro* de *J. regia*. A sacarose é comumente usada na concentração de 30 g/l (Bourrain, 2009; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011).

Para determinar as concentrações de BAP mais adequadas às fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *J. regia*, Saadat e Hennerty (2002) testaram cinco concentrações de BAP (0,2 mg/l, 0,4 mg/l, 0,6 mg/l, 0,8 mg/l e 1 mg/l), suplementadas com a auxina IBA na concentração de 0,01 mg/l. As maiores taxas de multiplicação dos rebentos foram obtidas com as concentrações de BAP mais elevadas de 0,8 mg/l e 1 mg/l, em consequência de uma maior taxa de gomos axilares desenvolvidos. Em *J. regia*, o uso de BAP a concentrações superiores (2 a 5 mg/l) leva frequentemente a alterações morfológicas nas folhas e rebentos (Revilla *et al.*, 1989). A utilização de BAP na concentração de 1 mg/l, normalmente suplementada com IBA na concentração de 0,01 mg/l, apresenta uma aplicação mais ou menos generalizada nas fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos e variedades de *J. regia* (Driver e Kuniyuki, 1984; Gruselle *et al.*, 1987; McGranahan e Leslie, 1988;

Penuela *et al.*, 1988; Revilla *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 1989; Saadat e Hennerty, 2002; Leal *et al.*, 2007; Carlos, 2014).

Segundo vários autores (Jay-Allemand *et al.*, 1992; Ripetti *et al.*, 1994; Scaltsoyiannes *et al.*, 1997; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2004), as auxinas apresentam um efeito positivo no enraizamento durante a subfase de indução radicular da fase de enraizamento, contudo, o seu contacto prolongado com os rebentos inibe o desenvolvimento radicular durante a subfase de expressão radicular em *J. regia*. Assim, durante a fase de enraizamento de *J. regia* são comumente utilizados dois meios de cultura. Um meio suplementando com auxina utilizado durante a subfase de indução radicular para promover a formação de primórdios radiculares e outro sem auxina e com a adição de vermiculite para um maior arejamento do meio, utilizado durante a subfase de expressão radicular para promover o desenvolvimento dos primórdios radiculares neoformados em raízes e facilitar posteriormente, a aclimatização das plântulas (Jay-Allemand *et al.*, 1992).

Segundo Scaltsoyiannes *et al.* (1997), na subfase de indução radicular os rebentos com 4 a 5 cm deviam ser transferidos para meio DKW com os macronutrientes reduzidos a $\frac{1}{4}$, suplementado com IBA na concentração de 5 mg/l e sacarose na concentração de 30 g/l e de seguida, colocados no escuro durante 6 a 10 dias a 24 °C durante 16 horas e 21 °C nas restantes 8 horas. De acordo com Payghamzadeh e Kazemitabar (2011), ainda que por uma questão de equilíbrio nutricional se faça a redução generalizada dos macronutrientes, na verdade, é o decréscimo na concentração de nitrato de potássio (KNO_3) e de nitrato de amónia (NH_4NO_3) o fator que verdadeiramente conduz ao aumento da taxa de enraizamento. Segundo Carlos (2014), apesar de *J. regia* responder positivamente ao escuro e à aplicação de IBA na subfase de indução radicular, a concentração de IBA ótima a utilizar e a duração do período de indução no escuro são fortemente influenciados pelo genótipo. De acordo com Vahdati *et al.* (2004), o período de indução do enraizamento no escuro depende da concentração de auxina no meio de enraizamento.

A concentração de sacarose nos meios de indução e expressão radicular afeta também significativamente a taxa de enraizamento de *J. regia* (Vahdati *et al.*, 2004). A utilização de uma concentração mais baixa de sacarose nos meios de enraizamento não é consensual. Segundo Dolcet-Sanjuan *et al.* (2004), durante a fase de enraizamento a concentração de sacarose devia ser reduzida para 15 g/l. Contrariamente, Vahdati *et al.* (2004) reportaram uma taxa de enraizamento superior em *J. regia* com sacarose na concentração de 30 g/l e máxima com sacarose na concentração de 40 g/l até 60 g/l. Contudo, a concentração de sacarose não influenciou significativamente o número e a qualidade das raízes formadas. Segundo

estes autores, o aumento da taxa de enraizamento com a elevada concentração de sacarose pode dever-se à elevada razão C:N no meio de cultura. Peixe (comunicação pessoal, citado em Carlos, 2014) testou várias concentrações de sacarose (10, 20, 30 e 40 mg/l) em meio DKW com os macronutrientes reduzidos a $\frac{1}{4}$ no enraizamento *in vitro* de Vlach, tendo obtido a maior taxa de enraizamento com a concentração de sacarose de 30 g/l, a mesma que tinha utilizado durante a fase de multiplicação *in vitro*.

Segundo Scaltsoyiannes *et al.* (1997), na subfase de expressão radicular os rebentos deviam ser transferidos para vermiculite humedecida com o meio DKW com os macronutrientes reduzidos a $\frac{1}{4}$ e sem reguladores de crescimento. Leal *et al.* (2007) indicavam o uso nesta subfase de uma mistura de vermiculite e perlite na proporção de 220:250 (v/v), humedecida com o meio DKW com os macronutrientes reduzidos a $\frac{1}{4}$ e sem reguladores de crescimento, e o uso de um fotoperíodo de 16/8 horas. Mais recentemente, Carlos (2014) testou diferentes substratos na subfase de expressão radicular de Vlach, nomeadamente cubos de lã de rocha, Jiffy Preformas®, pastilhas de turfa prensada e vermiculite humedecida (controlo). A maior taxa de enraizamento (78%) e de aclimatização (75%) de Vlach foi obtida com o substrato Jiffy Preformas®. Segundo Carlos (2014), durante a subfase de expressão radicular de *J. regia* devem ser fornecidas condições intermédias às condições *in vitro* e *ex vitro*, através da introdução de vermiculite e/ou perlite no meio de cultura.

Relativamente à fase de aclimatização *ex vitro*, segundo Leal *et al.* (2007) após a lavagem com água corrente das raízes das plântulas para a remoção do meio de cultura, estas deviam ser colocadas em tabuleiros de alvéolos de poliestireno com uma mistura de vermiculite e perlite na proporção de 220:250 (v/v), humedecida com o meio DKW com os macronutrientes reduzidos a $\frac{1}{4}$ e sem reguladores de crescimento, e depois colocadas na estufa. Durante a primeira semana, as plantas deviam ser regadas por nebulização (sistema de brumização) em intervalos de 15 minutos durante cerca de 10 segundos, de forma a assegurar uma humidade perto de 100%. Após a observação de crescimento apical, os eventos de rega deviam ser gradualmente distanciados e a ventilação da estufa devia aumentar.

A grande sensibilidade das plântulas de *J. regia* resulta frequentemente na paragem do crescimento apical durante a fase de aclimatização (Vahdati *et al.*, 2004). Segundo estes autores, o tratamento com Promalina na concentração de 25 ml/l quebra eficazmente a dormência do meristema apical, promovendo o crescimento das plântulas através da estimulação do alongamento das zonas internodais.

Relativamente à fase de pós-aclimatização, alguns autores referiam um aumento na taxa de sobrevivência de *J. regia* mediante a inoculação das plântulas com micorrizas

de uma grande variedade de fungos do filo *Glomeromycota* (Schübler *et al.*, 2001; Bourrain, 2009). Schübler *et al.* (2001) obtiveram taxas de sobrevivência no campo de 80% para as plantas micorrizadas e apenas 20% de sobrevivência no controlo. Segundo estes autores, a elevada taxa de sobrevivência conseguida na fase de pós-aclimatização podia dever-se ao facto do fungo inoculado promover o desenvolvimento de um sistema radical mais forte e eficiente na capacidade de absorção de água e nutrientes, reduzindo assim, a chamada crise de transplantação. Contrariamente, em Carlos (2014) a inoculação com fungos micorrízicos não melhorou significativamente a taxa de sobrevivência das plantas.

As dificuldades descritas inerentes à propagação *in vitro* destes porta-enxertos justificam a ainda residual utilização desta técnica na produção comercial em larga escala destas plantas. Apesar dos porta-enxertos GF677 e Vlach serem já reproduzidos *in vitro*, existem ainda algumas limitações como os elevados custos de produção e a dificuldade em obter um elevado número de plantas.

1.6. Objetivos do estágio

A crescente procura do mercado pelos porta-enxertos GF677 e Vlach justificou a necessidade da Deifil em implementar, desenvolver e otimizar protocolos de produção *in vitro* para estas duas culturas. Desta forma, o principal objetivo deste estágio foi o desenvolvimento de protocolos de produção *in vitro* dos porta-enxertos GF677 e Vlach eficazes e rentáveis, tendo em consideração a literatura publicada e as condições e recursos existentes na empresa. O objetivo final era a produção de um elevado número de plantas com baixos custos de produção unitária. Nesse sentido, foi feita a indução da formação de rebentos epicórmicos, a otimização do pré-tratamento das plantas-mãe, a otimização do método de desinfeção dos explantes, a realização de estabelecimentos em diferentes épocas do ano, a propagação *in vitro* destes porta-enxertos mediante diferentes vias de regeneração clonal como a rebentação axilar e a organogénese indireta e a otimização da composição do meio de cultura ou substrato ao longo das várias fases do processo. Adicionalmente, foi feita a comparação de diferentes clones do porta-enxertos GF677 de modo a detetar diferenças entre os genótipos e desta forma selecionar os melhores clones para a propagação *in vitro* em grande escala.

O objetivo definido para GF677 foi alcançado, isto é, foram otimizadas todas as fases do processo de propagação *in vitro*. No caso de Vlach, apenas se otimizou o processo de propagação *in vitro* até à fase de estabelecimento.

Para além disso, este estágio permitiu-me adquirir novos conhecimentos teóricos e práticos na área da biotecnologia vegetal e desenvolver competências técnicas e profissionais em contexto real de trabalho. Para a Deifil, o trabalho desenvolvido contribuiu para o desenvolvimento de protocolos de produção *in vitro* eficientes e rentáveis para estes dois porta-enxertos.

Futuramente, os protocolos de produção *in vitro* desenvolvidos durante este estágio deverão continuar a ser otimizados, de forma a poderem ser utilizados pela empresa para a produção destas plantas à escala industrial e com um custo competitivo no mercado.

Capítulo 2 - Material e Métodos

2.1. Material vegetal

2.1.1. Seleção e pré-tratamento das plantas-mãe

As plantas-mãe dos porta-enxertos GF677 (5 clones: I, II, III, IV e V) e Vlach (4 clones: 0, 1, 2 e 3), com idades compreendidas entre 3 meses e 1 ano, encontravam-se em condições de estufa e de campo e estufa, respetivamente (Anexo 1). No caso de GF677, uma parte das plantas-mãe não foi sujeita a nenhum pré-tratamento fitossanitário antes da recolha de explantes para o estabelecimento *in vitro*. A outra parte das plantas foi sujeita a um pré-tratamento com o antifúngico Switch® (Syngenta®) na concentração de 3 g/l, duas e quatro semanas antes da recolha dos explantes. No caso do porta-enxertos Vlach, as plantas-mãe foram apenas sujeitas a um pré-tratamento com o antifúngico Switch® na concentração de 3 g/l, duas semanas antes da recolha dos explantes para o estabelecimento *in vitro*.

O antifúngico Switch® é um antifúngico sistémico e de superfície, indicado para combater a podridão cinzenta (*Botrytis* spp.). Este antifúngico apresenta uma elevada eficácia e uma persistência de acção de 10 a 12 dias. O tratamento consistiu na pulverização das plantas com o produto.

2.1.2. Recolha de material vegetal

A recolha de material vegetal do porta-enxertos GF677 foi realizada nos meses de setembro de 2016 e de março e abril de 2017. Os ramos mais jovens das plantas-mãe de GF677 (5 clones) foram cortados com uma tesoura previamente desinfetada com etanol a 70% (v/v) em fragmentos com 15 a 20 cm de comprimento, cortadas as suas folhas e colocados em frascos de vidro separados, identificados e transferidos para o laboratório.

A recolha de material vegetal do porta-enxertos Vlach foi realizada nos meses de setembro e outubro de 2016 e de maio e junho de 2017. Os gomos axilares e apicais dos ramos jovens da planta-mãe de Vlach (clone 0) foram excisados com um bisturi previamente desinfetado com etanol a 70% (v/v) e colocados num frasco de vidro transferido para o laboratório. As folhas mais jovens de Vlach (clone 0) foram igualmente cortadas com uma tesoura previamente desinfetada com etanol a 70% (v/v) e colocadas num frasco de vidro levado para o laboratório. Finalmente, os ramos mais jovens das plantas-mãe (4 clones) foram cortados com uma tesoura previamente

desinfetada com etanol a 70% (v/v) em fragmentos com 15 a 20 cm de comprimento, cortadas as suas folhas e colocados num frasco de vidro transferido para o laboratório.

2.1.2.1. Indução da formação de rebentos epicórmicos

Devido à escassez de material juvenil de Vlach e GF677 para a realização de estabelecimentos *in vitro*, no outono (outubro e dezembro, respetivamente) foram recolhidos alguns ramos adultos de algumas plantas-mãe, com o objetivo de induzir a formação de rebentos epicórmicos. No caso de GF677, foi recolhido material apenas dos clones I, II, III e IV e no caso de Vlach foi recolhido material apenas do clone 0. Após o corte das folhas, este material foi sujeito a um pré-tratamento por imersão no antifúngico Switch® na concentração de 3 g/l, durante cerca de 1 hora. De seguida, o material vegetal foi retirado da solução e deixado a secar ao ar livre sobre uma folha de papel adsorvente. Finalmente, foi acondicionado num saco plástico, devidamente identificado e colocado no frigorífico a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 43 (GF677), 90 e 99 (Vlach) dias.

Após esse período de tempo, o material vegetal foi retirado do frigorífico e de seguida, lavado abundantemente em água corrente (aproximadamente 30 segundos) de forma a remover os resíduos de antifúngico. Posteriormente, foi colocado em frascos de vidro com 100 ml de água da torneira. De seguida, no caso de GF677 todo o material vegetal foi pulverizado com BAP na concentração de 2 mg/l (4 a 5 pulverizações). Relativamente a Vlach, uma parte do material vegetal foi pulverizado com BAP na concentração de 2 mg/l (4 a 5 pulverizações) e a outra parte não (controlos). No caso de GF677, não foi possível realizar controlos (sem a aplicação de BAP) devido à escassez de material vegetal disponível para os ensaios. A pulverização dos ramos adultos com BAP foi efetuada uma vez por semana durante seis semanas.

O material vegetal foi incubado numa sala de crescimento à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com um fotoperíodo de 16/8 horas (lâmpadas fluorescentes brancas frias), de forma a induzir a formação de rebentos epicórmicos para a realização de novos estabelecimentos *in vitro* (Anexo 2). Estes testes tiveram como base os ensaios realizados por Gomes e Canhoto (2009) na cultura do medronheiro.

Após seis semanas, os rebentos epicórmicos apenas de Vlach (em todos os estados de desenvolvimento) foram sujeitos a um processo químico de desinfeção e de seguida, inoculados em meio de cultura. O mesmo não pôde ser realizado com os rebentos epicórmicos de GF677 pois contaminaram e foram descartados.

2.2. Propagação *in vitro* das culturas

2.2.1. Materiais e procedimentos relativos ao processo de propagação *in vitro*

A desinfecção das mãos do operador e da bancada de trabalho na câmara de fluxo laminar foi feita com etanol a 70% (v/v). As pinças e bisturis utilizados para a manipulação do material vegetal foram esterilizados utilizando um esterelizador por infravermelhos a 900 °C durante 4 a 6 segundos.

Os meios de cultura preparados, após distribuição nos recipientes de cultura, foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Como recipientes de cultura foram utilizados tubos de ensaio e frascos de cultura de vidro. Os tubos de ensaio continham 5 a ml de meio e os frascos de cultura 50 ml.

2.2.2. Estabelecimento *in vitro*

2.2.2.1. Desinfecção do material vegetal

Para o estabelecimento *in vitro* dos porta-enxertos GF677 e Vlach, procedeu-se à desinfecção do material vegetal recolhido das plantas-mãe. No caso de GF677, os ramos jovens recolhidos foram inicialmente passados em água corrente e de seguida, emergidos numa solução de água e sabão comercial (Cif®), durante 10 minutos. A função do detergente é diminuir a tensão superficial da água, facilitando a desinfecção do material vegetal. Depois, efetuaram-se pelo menos quatro lavagens com água destilada para a remoção de resíduos de detergente. De seguida, fez-se a lavagem do material vegetal com o antifúngico Switch® na concentração de 3 g/l, durante 5 minutos. Novamente, realizaram-se pelo menos quatro lavagens com água destilada para a remoção de resíduos de Switch®. Seguiu-se a lavagem do material vegetal com o antibacteriano VEG'LYS® na concentração de 10 µl/l, durante 5 minutos. O VEG'LYS® (Phytoauxillium®) é uma solução natural, mais especificamente um extrato de alho com atividade antibacteriana. De seguida, efetuaram-se novamente pelo menos quatro lavagens com água destilada para a remoção de resíduos de VEG'LYS e posteriormente, o material vegetal foi colocado em frascos de vidro estéreis em etanol a 70% (v/v), durante 1 minuto. Realizaram-se novamente pelo menos quatro lavagens com água destilada e adicionou-se ao material vegetal lixívia comercial (DIA®) a 30% com 5% de hipoclorito de sódio, durante 10 e 20 minutos.

As várias lavagens descritas foram feitas sob agitação de forma a garantir a total desinfecção do material vegetal e para evitar a mistura entre os agentes desinfetantes, o que poderia originar diversas reações químicas e provocar toxicidade nos tecidos

vegetais. Finalmente, os frascos de vidro estéreis com o material vegetal em lixívia foram levados para a câmara de fluxo laminar (condições de assepsia). Aí efetuaram-se pelo menos 4 lavagens com água destilada estéril para a remoção de resíduos de lixívia.

O método de desinfecção dos gomos e rebentos epicórmicos de Vlach foi idêntico ao descrito anteriormente para GF677, à exceção de que nestes casos se adicionou ao material vegetal, lixívia comercial a 40% durante 20 minutos. O aumento na percentagem de lixívia teve que ver com o maior grau de contaminação dos explantes do género *Juglans* (Claudot *et al.*, 1992; Ripetti *et al.*, 1994; Chenevard *et al.*, 1995; Saadat e Hennerty, 2001; Leal *et al.*, 2007; Peixe *et al.*, 2016). Adicionalmente, no caso dos gomos, estes foram colocados numa placa de micropoços com o antibiótico Ampicilina-Sódio na concentração de 50 mg/l (Caisson Labs®) durante 30 minutos, de forma a eliminar possíveis contaminações bacterianas comuns nos explantes do género *Juglans*.

O método de desinfecção das folhas de Vlach foi igualmente semelhante ao descrito para GF677, à exceção de que neste caso se adicionou ao material vegetal, lixívia comercial a 20% durante 20 minutos. A diminuição na percentagem de lixívia teve que ver com a maior sensibilidade das folhas.

Finalmente, o método de desinfecção dos ramos jovens de Vlach foi exatamente igual ao descrito para GF677.

2.2.2.2. Indução da rebentação axilar

Para a indução da rebentação axilar da cultura de GF677 foram utilizados como explantes segmentos nodais e apicais, com 2 a 3 cm de comprimento. Na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677 foram testados 4 meios de cultura, apresentados no quadro 6. Todos os meios de cultura apresentavam um pH compreendido entre 5,6 e 5,8. Os explantes permaneceram quatro semanas nestes meios de cultura numa sala de crescimento à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com um fotoperíodo de 16/8 horas (lâmpadas fluorescentes brancas frias). Em cada semana foi avaliada a taxa de contaminação, sobrevivência e de explantes com formação de rebentos axilares de cada clone.

Quadro 6 - Meios de cultura testados na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677.

Meio de cultura	Sigla da empresa	Composição	Concentração
M1	M(Myo)0,1B	MS (Caisson Labs®-Anexo 3)	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS (Anexo 3)	1 mg/ml
		Mio-inositol	10 mg/l
		BAP	0,1 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend® (Caisson Labs®)	7 g/l
M2	M(Myo)0,5B	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	10 mg/l
		BAP	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M3	W0,5Z	WPM (Caisson Labs®-Anexo 4)	2,30 g/l
		Vitaminas meio WPM (Anexo 4)	1 mg/ml
		Mio-inositol	1 mg/ml
		Zeatina	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M4	W0,5ZMEAA	WPM	2,30 g/l
		Vitaminas meio WPM	1 mg/ml
		Mio-inositol	1 mg/ml
		Zeatina	0,5 mg/l
		Tampão MÊS	1 mg/ml
		Ácido ascórbico	1 mg/ml
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l

Para a indução da rebentação axilar da cultura de Vlach foram utilizados como explantes gomos axilares e apicais, rebentos epicórmicos e segmentos nodais e apicais com 2 a 3 cm de comprimento. Na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach, no caso dos gomos axilares e apicais foi testado apenas 1 meio de cultura (meio M1). No caso dos rebentos epicórmicos (todos os estados de desenvolvimento) foram

testados 2 meios de cultura (meios M2 e M3). Finalmente, no caso dos segmentos nodais e apicais foram testados 3 meios de cultura (meios M4, M5 e M6). Estes 6 meios de cultura são apresentados no quadro 7. Todos os meios de cultura apresentavam um pH compreendido entre 5,6 e 5,8. No caso dos gomos axilares e apicais e dos rebentos epicórmicos, estes explantes permaneceram seis a nove semanas nos respetivos meios de cultura numa sala de crescimento à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com um fotoperíodo de 16/8 horas (lâmpadas fluorescentes brancas frias). Após seis a nove semanas foram subcultivados para meio de cultura novo. Relativamente aos segmentos nodais e apicais, estes explantes permaneceram apenas quatro semanas no respetivo meio de cultura. Em cada semana foi avaliada a taxa de contaminação, sobrevivência e de explantes com formação de rebentos axilares de cada clone.

Quadro 7 - Meios de cultura testados na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach.

Meio de cultura	Sigla empresa	Composição	Concentração
M1	D1B0,01I	DKW (Caisson Labs®-Anexo 5)	5,22 g/l
		Vitaminas meio DKW (Anexo 5)	10 mg/l
		Mio-inositol	100 mg/l
		BAP	1 mg/l
		IBA	0,01 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M2	M0	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	100 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M3	1/2M	MS	2,165 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l

M4	W0,5B1PTC ³	WPM	2,30 g/l
		Vitaminas meio WPM	1 mg/ml
		Mio-inositol	1 mg/ml
		BAP	0,5 mg/l
		PTC ³ ® - <i>plant tissue culture contamination control</i> (PhytoTechnology Laboratories®)	1 ml/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M5	W0,5B1PTC ³ (líquido)	WPM	2,30 g/l
		Vitaminas meio WPM	1 mg/ml
		Mio-inositol	1 mg/ml
		BAP	0,5 mg/l
		PTC ³ ®	1 ml/l
		Sacarose	30 g/l
M6	M(My0)0,5B 1PTC ³	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	10 mg/l
		BAP	0,5 mg/l
		PTC ³ ®	1 ml/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l

2.2.2.3. Indução da organogénese indireta

Para a indução da organogénese indireta da cultura de GF677 foram utilizados como explantes fragmentos foliares com aproximadamente 1 cm² contendo a nervura principal, obtidos de plantas *in vitro*. Os explantes foram inoculados com a página adaxial em contacto com o meio de cultura M2C0,5IA. O meio de cultura M2C0,5IA era composto pelo meio basal MS na concentração de 4,33 g/l, Vitaminas do meio MS na concentração de 1 mg/ml, Mio-inositol na concentração de 100 mg/l, CPPU na concentração de 2 mg/l, IAA na concentração de 0,5 mg/l, Sacarose na concentração de 30 g/l e Agar Phytoblend® na concentração de 7 g/l. Este meio apresentava um pH compreendido entre 5,6 e 5,8. A formulação nutritiva M2C0,5I apresentou bons resultados noutras espécies testadas anteriormente (Deifil, resultados não publicados). Os explantes permaneceram oito semanas neste meio de cultura numa sala de

crescimento à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com um fotoperíodo de 16/8 horas (lâmpadas fluorescentes brancas frias).

Para a indução da organogénese indireta da cultura de Vlach foram utilizados como explantes fragmentos foliares com aproximadamente 1 cm^2 contendo a nervura principal, obtidos de plantas *ex vitro*. Os explantes foram inoculados com a página adaxial em contacto com o meio de cultura D2C0,5IA. O meio de cultura D2C0,5IA era composto pelo meio basal DKW na concentração de 5,22 g/l, Vitaminas do meio DKW na concentração de 10 mg/l, Mio-inositol na concentração de 100 mg/l, CPPU na concentração de 2 mg/l, IAA na concentração de 0,5 mg/l, Sacarose na concentração de 30 g/l e Agar Phytoblend® na concentração de 7 g/l. Este meio apresentava um pH compreendido entre 5,6 e 5,8. O meio de cultura D2C0,5IA é uma adaptação para o género *Juglans* da formulação M2C0,5I. Os explantes permaneceram seis semanas neste meio de cultura numa sala de crescimento à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com um fotoperíodo de 16/8 horas (lâmpadas fluorescentes brancas frias).

2.2.3. Multiplicação *in vitro*

Após quatro semanas de cultura, os rebentos de GF677 obtidos na fase anterior foram transferidos para meio de multiplicação. Para isso, os rebentos foram excisados do explante inicial, cortadas as suas folhas e inoculados 5 rebentos por frasco de cultura. Na fase de multiplicação *in vitro* de GF677 foram testados 14 meios de cultura, apresentados no quadro 8. Todos os meios de cultura apresentavam um pH compreendido entre 5,6 e 5,8. De forma a distinguir os diferentes meios de cultura testados, foi adicionado a cada um deles um corante na concentração de 0,2 g/ml (F320 - verde, F321 - amarelo, F322 - azul, F323 - vermelho da PhytoTechnology Laboratories®). Após inoculação, os explantes foram colocados na sala de crescimento. As condições da sala de crescimento foram as referidas anteriormente.

A cada quatro a sete semanas foi feita a subcultura dos rebentos de GF677 para meio de cultura novo. Para isso, os rebentos obtidos foram separados, cortadas as suas folhas e inoculados 5 rebentos por frasco de cultura. No total foram feitas cerca de 10 repicagens dos rebentos de GF677 para meio de multiplicação. Em cada repicagem foi avaliada a taxa de contaminação, sobrevivência e multiplicação de cada clone.

Quadro 8 - Meios de cultura testados na fase de multiplicação *in vitro* de GF677.

Meio de cultura	Sigla da empresa	Composição	Concentração
M1	M0	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	100 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M2	M0,1B	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	100 mg/l
		BAP	0,1 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M3	M(My0)0,1B	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	10 mg/l
		BAP	0,1 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M4	M0,5B	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	100 mg/l
		BAP	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M5	M(My0)0,5B	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	10 mg/l
		BAP	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l

M6	M(My0)0,5B6Ag	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	10 mg/l
		BAP	0,5 mg/l
		\Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	6 g/l
M7	M(My0)0,5B5Ag	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	10 mg/l
		BAP	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	5 g/l
M8	M(My0)1B	MS	4,33 g/l
		Vitaminas meio MS	1 mg/ml
		Mio-inositol	10 mg/l
		BAP	1 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M9	$\frac{1}{2}$ M	MS	2,165 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M10	$\frac{1}{2}$ M0,5B	MS	2,165 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		BAP	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M11	$\frac{1}{2}$ M0,5B6Ag	MS	2,165 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		BAP	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	6 g/l

M12	$\frac{1}{2}$ M0,5B5Ag	MS	2,165 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		BAP	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	5 g/l
M13	W0	WPM	2,30 g/l
		Vitaminas meio WPM	1 mg/ml
		Mio-inositol	1 mg/ml
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M14	W0,5B	WPM	2,30 g/l
		Vitaminas meio WPM	1 mg/ml
		Mio-inositol	1 mg/ml
		BAP	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l

No caso de Vlach, após quatro semanas de cultura os rebentos obtidos na fase anterior foram transferidos para meio de multiplicação. Para isso, os rebentos foram excisados do explante inicial, cortadas as suas folhas e inoculados 5 rebentos por frasco de cultura. Na fase de multiplicação *in vitro* de Vlach foi testado apenas 1 meio de cultura, utilizado com sucesso na fase de estabelecimento *in vitro* (meio de estabelecimento M4). Após inoculação, os explantes foram colocados na sala de crescimento. As condições da sala de crescimento foram as referidas anteriormente. Após quatro semanas foi feita a subcultura dos rebentos de Vlach para meio de cultura novo. Para isso, os rebentos obtidos foram separados, cortadas as suas folhas e inoculados 5 rebentos por frasco de cultura. No total foi feita apenas 1 repicagem dos rebentos de Vlach para meio de multiplicação. Nesta repicagem foi avaliada a taxa de contaminação, sobrevivência e multiplicação de cada clone.

2.2.4. Enraizamento *in vitro*

Após quatro semanas de cultura, os rebentos de GF677 obtidos na fase anterior, com 2 a 3 cm de comprimento, foram transferidos para meio de enraizamento. Para isso, os rebentos foram separados, cortadas as suas folhas e inoculados 5 rebentos por frasco de cultura. Na fase de enraizamento *in vitro* de GF677 foram testados 8 meios

de cultura, apresentados no quadro 9. Todos os meios de cultura apresentavam um pH compreendido entre 5,6 e 5,8. Após inoculação, os explantes foram colocados na sala de crescimento. As condições da sala de crescimento foram as referidas anteriormente.

Após quatro semanas de cultura, foi avaliada a taxa de enraizamento, o número de raízes por plântula, o seu comprimento médio e diâmetro em cada meio de cultura. Os testes de enraizamento foram efetuados apenas com o clone II de GF677 por este ser o clone com o maior número de explantes disponível.

Quadro 9 - Meios de cultura testados na fase de enraizamento *in vitro* de GF677.

Meio de cultura	Sigla da empresa	Composição	Concentração
M1	$\frac{1}{2}$ M	MS	2,165 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M2	$\frac{1}{2}$ M1CA	MS	2,165 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		Carvão ativado	1 g/l
		Sacarose	30 g/l
M3	$\frac{1}{2}$ M0,1I	MS	2,165 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		IBA	0,1 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M4	$\frac{1}{2}$ M0,2I	MS	2,165 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		IBA	0,2 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l

M5	MS _{1/2} nitratos ($\frac{1}{2}$ KNO ₃ + $\frac{1}{2}$ NH ₄ NO ₃)	MS _{1/2} nitratos (Caisson Labs®- Anexo 6)	2,56 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M6	MS _{1/2} nitratos 0,2l	MS _{1/2} nitratos	2,56 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		IBA	0,2 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M7	MS _{1/2} nitratos 0,5l	MS _{1/2} nitratos	2,56 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		IBA	0,5 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l
M8	MS _{1/2} nitratos 1l	MS _{1/2} nitratos	2,56 g/l
		Vitaminas meio MS	0,5 mg/ml
		Mio-inositol	50 mg/l
		IBA	1,0 mg/l
		Sacarose	30 g/l
		Agar Phytoblend®	7 g/l

No caso de Vlach não se chegaram a realizar testes de otimização relativos a esta fase da propagação *in vitro*.

2.2.5. Aclimatização *ex vitro*

Após quatro semanas de cultura no meio de enraizamento, foi feita a aclimatização *ex vitro* das plântulas de GF677. Nesta fase, as plântulas de GF677 enraizadas e não enraizadas foram lavadas com água corrente para a remoção do meio de cultura de enraizamento das plântulas e das raízes. Posteriormente, as plântulas de GF677 com raíz foram colocadas em caixas com uma mistura de turfa (turfa média Bor na Móna®) e perlite na proporção de 1:1 (v/v). Por outro lado, as plântulas de GF677 sem raíz

foram tratadas com o produto Clonex®. O Clonex® é um produto comercial com IBA na concentração de 3 g/l e que promove alegadamente o enraizamento *ex vitro* das plântulas. No caso das plântulas de GF677 sem raiz foram testados 2 substratos diferentes nesta fase, nomeadamente uma mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1 (v/v) e o substrato VECO3 (Jiffy Preformas®).

Finalmente, as plântulas de GF677 foram cobertas com uma tela de polietileno transparente e colocadas num estufim no interior da estufa, com uma humidade relativa superior a 90% e à temperatura ambiente (não controlada). A humidade relativa do ar foi gradualmente reduzida até 60% e as plântulas regadas semanalmente. A abertura de furos na tela foi feita gradualmente a cada 2 dias e sua remoção total ocorreu após 5 semanas. Após quatro semanas, foi avaliada a taxa de aclimação *ex vitro* (taxa de sobrevivência *ex vitro*) e o crescimento das plântulas aclimatizadas. Os testes de aclimação *ex vitro* foram efetuados apenas com o clone II de GF677 por este ser o clone com o maior número de explantes disponível. No caso de Vlach não se chegaram a realizar testes de otimização relativos a esta fase da propagação *in vitro*.

2.3. Análise estatística dos resultados

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi efetuado com recurso ao programa Excel. A análise estatística foi realizada através do cálculo das médias aritméticas ponderadas e dos desvios-padrões ponderados das taxas obtidas. Foi considerada a utilização das médias aritméticas e desvios-padrões ponderados ao invés das médias aritméticas e desvios-padrões simples, por se considerar a análise e o tratamento dos dados estatísticos mais rigorosa, uma vez que estes têm em consideração o tamanho das respetivas amostras. Cada amostra apresentava um $n \geq 100$ explantes.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1. Propagação *in vitro* do porta-enxertos GF677

3.1.1. Indução da formação de rebentos epicórmicos

Devido à escassez de material juvenil de GF677 e de forma a aumentar o número de explantes disponíveis para iniciar a propagação *in vitro*, foram recolhidos alguns ramos adultos de algumas plantas-mãe (4 clones: I, II, III e IV), com o objetivo de induzir a formação de rebentos epicórmicos. Este material vegetal, após um pré-tratamento com o antifúngico Switch®, foi sujeito a um tratamento pelo frio durante 43 dias. Após esse período de tempo, foi pulverizado com BAP uma vez por semana durante seis semanas (Figura 8 e Anexo 2).



Fig.8 - Indução da formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos dos clones I, II, III e IV de GF677.

Este método de indução da formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos de GF677 revelou-se adequado exclusivamente para o clone IV, pois este foi o único clone onde se verificou o início da formação de rebentos epicórmicos somente após sete dias da sua indução. Contudo, os rebentos formados começaram a secar após quatro semanas e acabaram por ser descartados por elevada contaminação fúngica após seis semanas (Figura 9). Os resultados obtidos com o clone IV, pareceram indicar que as contaminações dos tecidos vegetais podem estar na origem do insucesso na formação de rebentos epicórmicos nos clones I, II e III de GF677. Apesar dos escassos resultados, o facto de se ter verificado a formação de rebentos epicórmicos após apenas sete dias, parece indicar que a pulverização com BAP nos ramos adultos apresentou um efeito positivo na formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos de GF677.

Futuramente, dever-se-iam testar outros pré-tratamentos com concentrações superiores de Switch®, outros antifúngicos ou a combinação de dois ou mais

antifúngicos. Dever-se-iam também realizar novos testes com e sem pulverização com diferentes concentrações de BAP, de modo a confirmar o efeito desta citocinina na formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos de GF677.

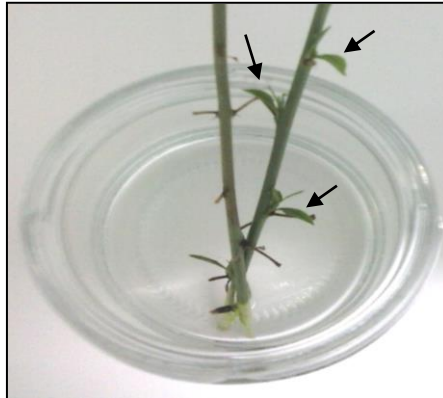


Fig.9 - Rebentos epicórmicos formados exclusivamente nos ramos adultos do clone IV de GF677, após sete dias de indução.

3.1.2. Estabelecimento *in vitro*

3.1.2.1. Pré-tratamento das plantas-mãe e desinfecção do material vegetal

Uma parte das plantas-mãe de GF677 não foi sujeita a nenhum pré-tratamento fitossanitário antes da recolha dos explantes para o estabelecimento *in vitro*. A outra parte das plantas foi sujeita a um pré-tratamento com o antifúngico Switch®, duas e quatro semanas antes da recolha dos explantes. O objetivo destes 3 testes com diferentes pré-tratamentos das plantas-mãe (sem pré-tratamento, com pré-tratamento duas e quatro semanas antes da recolha de explantes) foi determinar o efeito do pré-tratamento fitossanitário das plantas-mãe na taxa de contaminação dos explantes de GF677 na fase de estabelecimento *in vitro* (Gráfico 1).

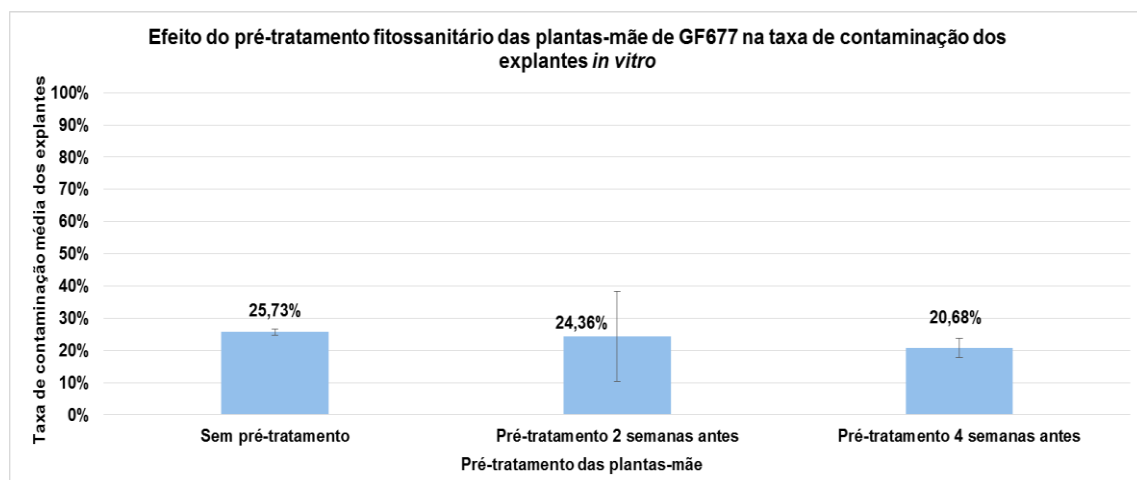


Gráfico 1 - Avaliação do efeito do pré-tratamento fitossanitário das plantas-mãe na taxa de contaminação dos explantes de GF677 na fase de estabelecimento *in vitro*.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 1, ambos os pré-tratamentos das plantas-mãe com o antifúngico Switch® conduziram a baixas taxas de contaminação e elevadas taxas de sobrevivência médias dos explantes *in vitro*. Foi obtida uma taxa de contaminação média dos explantes *in vitro* ligeiramente superior (25,73%) na situação controlo, todavia, não pareceram existir diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas de contaminação médias dos explantes *in vitro* entre os pré-tratamentos fitossanitários testados e a situação controlo. Após a análise destes resultados, pode-se concluir que o pré-tratamento fitossanitário das plantas-mãe não pareceu afetar significativamente a taxa de contaminação dos explantes *in vitro* e consequentemente, a fase de estabelecimento *in vitro* de GF677.

Desta forma, pelo menos nas duas épocas do ano em que foram efetuados os testes (setembro de 2016 e março e abril de 2017), não se justifica a realização de qualquer um destes pré-tratamentos das plantas-mãe antes da recolha dos explantes para o estabelecimento *in vitro*. Muito provavelmente, se os estabelecimentos de GF677 tivessem sido efetuados em outras épocas do ano de maior humidade (outono e inverno), ter-se-iam verificado diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas de contaminação dos explantes *in vitro* entre os pré-tratamentos fitossanitários das plantas-mãe testados, bem como taxas de contaminação dos explantes *in vitro* mais elevadas nas plantas-mãe sem pré-tratamento. Futuramente, dever-se-iam testar outros pré-tratamentos das plantas-mãe utilizando, por exemplo, outros agentes antifúngicos ou combinações de vários agentes desinfetantes.

Para o estabelecimento *in vitro* de GF677 procedeu-se à desinfecção do material vegetal recolhido das plantas-mãe (ramos jovens). O método de desinfecção dos ramos jovens de GF677 envolveu a sua passagem em água corrente, a imersão numa solução de água e sabão comercial, lavagem com o antifúngico Switch®, lavagem com o antibacteriano VEG´LYS®, lavagem com etanol a 70% (v/v) e finalmente, a lavagem com lixívia comercial a 30% durante 10 e 20 minutos. O objetivo destes 2 testes com diferentes tempos de contacto dos explantes com a lixívia (0 e 20 minutos) foi determinar o efeito do tempo de contacto com a lixívia na taxa de contaminação dos explantes de GF677 na fase de estabelecimento *in vitro* (Gráfico 2).

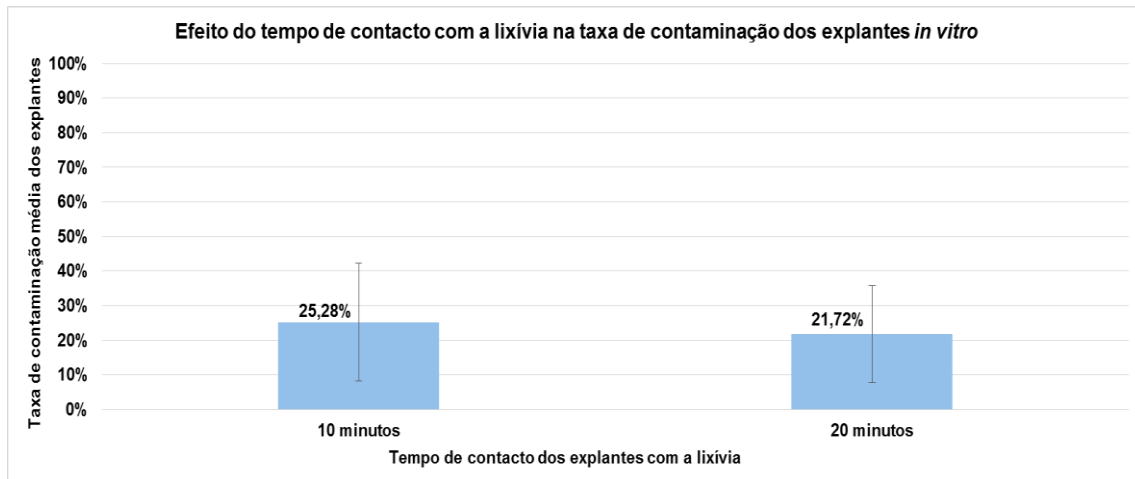


Gráfico 2 - Avaliação do efeito do tempo de contacto com a lixívia na taxa de contaminação dos explantes de GF677 na fase de estabelecimento *in vitro*.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 2, ambos os métodos de desinfecção dos ramos jovens de GF677 conduziram a baixas taxas de contaminação e elevadas taxas de sobrevivência médias dos explantes *in vitro*. O método de desinfecção dos explantes que envolvia um tempo de contacto de 20 minutos com lixívia a 30% demonstrou ser mais eficaz, pois resultou numa menor taxa de contaminação média dos explantes *in vitro* (21,72%). Contudo, não pareceram existir diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas de contaminação dos explantes *in vitro* entre os dois métodos de desinfecção dos explantes testados.

Estes resultados demonstram uma correlação negativa entre o tempo de contacto dos explantes com a lixívia e a taxa de contaminação dos explantes *in vitro*. No entanto, esta correlação não foi proporcional, pois não se verificou uma redução para metade da taxa de contaminação média dos explantes no teste com um tempo de contacto com a lixívia de 20 minutos relativamente ao teste com um tempo de contacto de 10 minutos.

Adicionalmente, a taxa de contaminação média dos explantes de GF677 foi substancialmente inferior à verificada em outras culturas lenhosas (Deifil, resultados não publicados). Perante estes resultados, pode-se concluir que a percentagem de lixívia testada (30%) foi adequada, uma vez que resultou em baixas taxas de contaminação e elevadas taxas de sobrevivência dos explantes *in vitro* em ambos os tempos de contacto testados.

Futuramente, poder-se-iam testar outros métodos de desinfecção dos explantes utilizando, por exemplo, outras combinações de agentes desinfetantes, outras concentrações e/ou tempos de contacto com os explantes.

3.1.2.2. Indução da rebentação axilar

Para a indução da rebentação axilar da cultura de GF677 foram utilizados como explantes segmentos nodais e apicais, com 2 a 3 cm de comprimento (Figura 10). Na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677 foram testados 4 meios de cultura (ver Quadro 6, página 63). O objetivo destes 4 testes com diferentes formulações minerais (MS e WPM), concentrações de BAP (0,1 mg/l e 0,5 mg/l) e concentrações dos compostos orgânicos tampão MES e ácido ascórbico (0 mg/ml e 1 mg/ml) foi otimizar a composição do meio de cultura a utilizar na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677 (Gráficos 3 e 4).

A propagação *in vitro* de GF677 é usualmente baseada nos meios de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), WPM (Woody Plant Medium, Lloyd e McCown, 1981) e GNH (Alanagh *et al.*, 2010). Segundo alguns autores (Tsiporidis e Thomidis, 2003; Aghaye e Yadollahi, 2012; Sepahvand *et al.*, 2012), durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de GF677 em meio MS observa-se frequentemente o surgimento de rebentos pequenos e com o formato de “roseta” (alargamento exagerado das folhas), devido às elevadas fontes de carbono presentes neste meio de cultura. Tsiporidis *et al.* (2003) e Kas *et al.* (2004) (citado em Sepahvand *et al.*, 2012) compararam diferentes meios de cultura para a propagação *in vitro* de GF677, tendo concluído que o meio ½ MS e Knop eram meios de cultura mais adequados comparativamente ao meio MS, pois nestes surgiam rebentos com um crescimento normal. Já Aghaye e Yadollahi (2012) e Sepahvand *et al.* (2012) recomendavam o uso do meio MS para a propagação *in vitro* de GF677, referindo que o crescimento anormal dos rebentos estava associado com a elevada concentração de mio-inositol neste meio (100 mg/l). Sepahvand *et al.* (2012) avaliaram os efeitos da redução da concentração de mio-inositol no meio MS na formação de rebentos com crescimento anormal, durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de GF677. Estes autores determinaram que a redução da concentração de mio-inositol de 100 mg/l para 10 mg/l no meio MS, conduzia ao surgimento de rebentos normais e com um maior comprimento médio (4,6 cm).

A citocinina BAP é comumente usada na propagação *in vitro* dos híbridos entre o pessegueiro e a amendoeira (*Prunus persica* x *Prunus dulcis*) (Fotopoulos e Sotiropoulos, 2005). Ahmad *et al.* (2003) determinaram que a concentração de BAP que conduzia a um maior número e comprimento médios dos rebentos durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de GF677 era de 0,6 mg/l. Já Sepahvand *et al.* (2012) apontavam como melhor concentração de BAP 0,1 mg/l e Aghaye e Yadollahi (2012) indicavam 1 mg/l. Esta disparidade nas concentrações

indicadas de BAP pode, provavelmente, dever-se ao diferente grau de pureza da citocinina usada em cada laboratório. Adicionalmente, estudos prévios feitos na Deifil (Deifil, resultados não publicados) determinaram que entre as concentrações de BAP de 0,1 mg/l e 1 mg/l, a mais indicada para a propagação *in vitro* de GF677 era a de 0,1 mg/l pois levava à redução do formato de “roseta” dos rebentos, ao maior número de rebentos por explante (taxa de multiplicação dos rebentos) e comprimento médios destes em meio MS. Finalmente, segundo Alanagh *et al.* (2010), o maior número de rebentos normais de GF677 foi obtido com o meio GNH suplementado com BAP na concentração de 0,5 mg/l e IBA na concentração de 0,1 mg/l.

Assim, e de acordo com a literatura citada, testou-se o meio de cultura M1, composto pelo meio MS com redução da concentração de mio-inositol para 10 mg/l e suplementado com BAP na concentração de 0,1 mg/l, na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677 (Figura 10). Adicionalmente, de forma a otimizar a concentração de BAP a utilizar na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677, testou-se um segundo meio de cultura, o meio M2, com uma concentração de BAP cinco vezes superior à do meio M1. Para além disso, foram testados outros dois meios de cultura compostos pelo meio WPM, muito utilizado na propagação *in vitro* de lenhosas, suplementado com uma outra citocinina, a zeatina, na concentração de 0,5 mg/l (meios M3 e M4). Como os rebentos de GF677 obtidos apresentavam um pequeno comprimento médio e à semelhança de outros testes realizados com sucesso na empresa noutras culturas lenhosas (Deifil, resultados não publicados), optou-se por testar um quarto meio de cultura composto também pelo antioxidante ácido ascórbico e o tampão MES na concentração de 1 mg/ml (meio M4).



Fig.10 - Estabelecimento *in vitro* de segmento nodal de GF677 no meio de cultura M1.

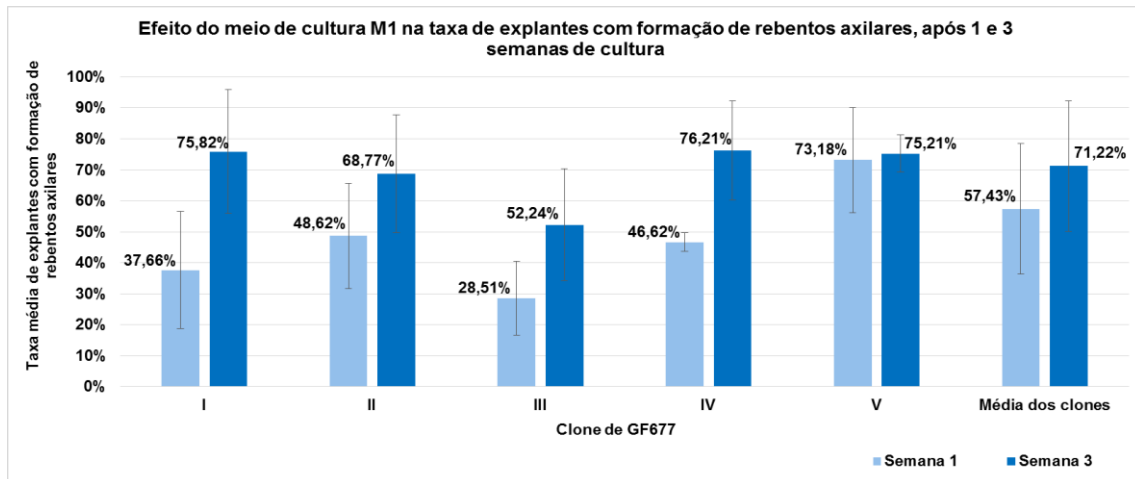


Gráfico 3 - Avaliação do efeito do meio de cultura M1 na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677, após uma e três semanas de cultura.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 3, o meio de cultura M1 demonstrou ser adequado à fase de estabelecimento *in vitro* de todos os clones de GF677, pois conduziu a elevadas taxas médias de explantes com formação de rebentos axilares. A formação dos primeiros rebentos axilares verificou-se logo após uma semana de cultura, em todos os clones de GF677. Contudo, o clone de GF677 com a melhor resposta na fase de estabelecimento *in vitro* neste meio de cultura, isto é, com a maior taxa média de explantes com formação de rebentos axilares após uma semana de cultura foi o clone V (73,18%). Assim sendo, foram testados os restantes meios de cultura M2, M3 e M4 exclusivamente neste clone (Gráfico 4).

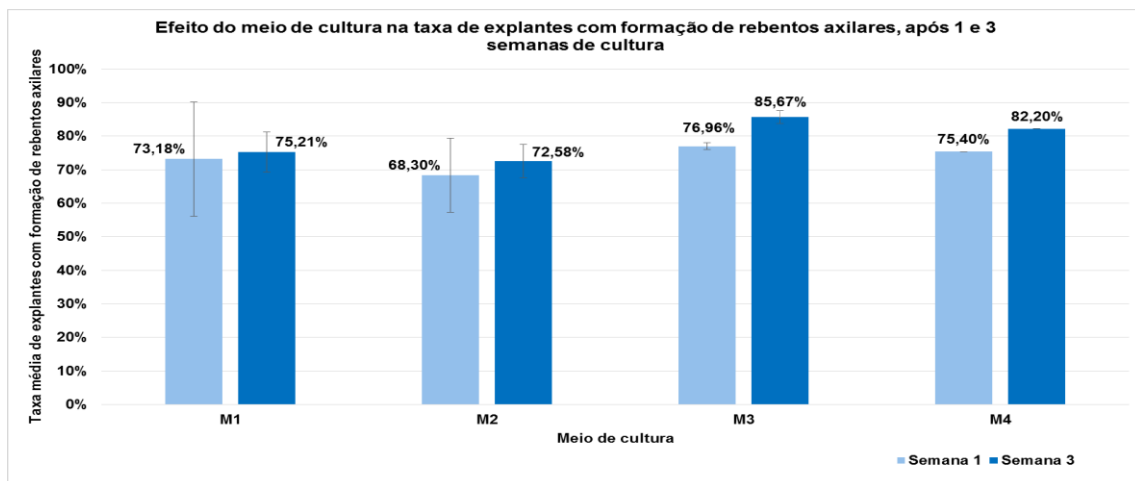


Gráfico 4 - Avaliação do efeito dos meios de cultura M1, M2, M3 e M4 na fase de estabelecimento *in vitro* do clone V de GF677, após uma e três semanas de cultura.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 4, os quatro meios de cultura testados demonstraram ser adequados à fase de estabelecimento *in vitro* do clone V de GF677, pois conduziram a elevadas taxas médias de explantes com formação de rebentos axilares e bons comprimentos médios destes, após uma e três semanas de

cultura. Nos quatro meios testados, a formação dos primeiros rebentos axilares verificou-se logo após uma semana de cultura. Para além disso, não pareceram existir diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas médias de explantes com formação de rebentos axilares no clone V, entre os meios testados, após uma e três semanas de cultura. No entanto, os meios de cultura com zeatina (meios M3 e M4) conduziram a taxas médias de explantes com formação de rebentos axilares ligeiramente superiores comparativamente aos meios com BAP (Meios M1 e M2). Todavia, o aumento verificado na taxa de explantes com formação de rebentos axilares não justificou a utilização da zeatina pois o seu custo é de 2812 \$/g, enquanto que o custo de BAP é de 5,2 \$/g (Phytotechnology Laboratories®). Para além disso, não se verificaram diferenças significativas relativamente ao comprimento médio dos rebentos entre os quatro meios, após uma e três semanas de cultura. Desta forma, não se repetiram os testes realizados com os meios M3 e M4, uma vez que a zeatina é uma citocinina muito cara.



Fig.11 - Rebento axilar formado em segmento nodal de GF677 no meio de cultura M1, após três semanas de cultura.

Concluindo, o meio de cultura mais adequado (mais eficaz e económico) à fase de estabelecimento *in vitro* de GF677 foi o meio de cultura M1, composto pelo meio MS com redução da concentração de mio-inositol para 10 mg/l e suplementado com BAP na concentração de 0,1 mg/l (Figura 11). Estes resultados estão de acordo com resultados obtidos por Aghaye e Yadollahi (2012) e Sepahvand *et al.* (2012).

3.1.2.3. Indução da organogénese indireta

Para a indução da organogénese indireta da cultura de GF677 foram utilizados como explantes fragmentos foliares com aproximadamente 1 cm² contendo a nervura principal, obtidos de plantas *in vitro* (Figura 12). Os explantes foram inoculados com a página adaxial em contacto com o meio de cultura M2C0,5IA, composto pelo meio MS suplementado com CPPU na concentração de 2 mg/l e IAA na concentração de 0,5

mg/l. Esta formulação nutritiva apresentou bons resultados noutras espécies (Deifil, resultados não publicados). O objetivo deste teste foi determinar se o meio de cultura M2C0,5IA promovia a organogénese indireta a partir de folha em GF677.



Fig.12 - Estabelecimento *in vitro* de fragmento foliar de GF677 no meio de cultura M2C0,5IA.

Os fragmentos foliares de GF677 foram obtidos de plantas *in vitro*, pelo que não foram sujeitos a nenhum processo de desinfeção. No total, realizaram-se dois ensaios com o meio de cultura M2C0,5IA. Este meio de cultura induziu a formação residual de *calli* (calogénese), entre a segunda e a quarta semanas de cultura (Figura 13). Apesar de se ter verificado a iniciação da formação de *calli*, ou seja, o processo de dediferenciação celular em alguns explantes, não ocorreu a diferenciação celular. Este meio de cultura não promoveu a organogénese indireta a partir de folha em GF677, contrariamente aos resultados obtidos anteriormente com outras espécies (Deifil, resultados não publicados).

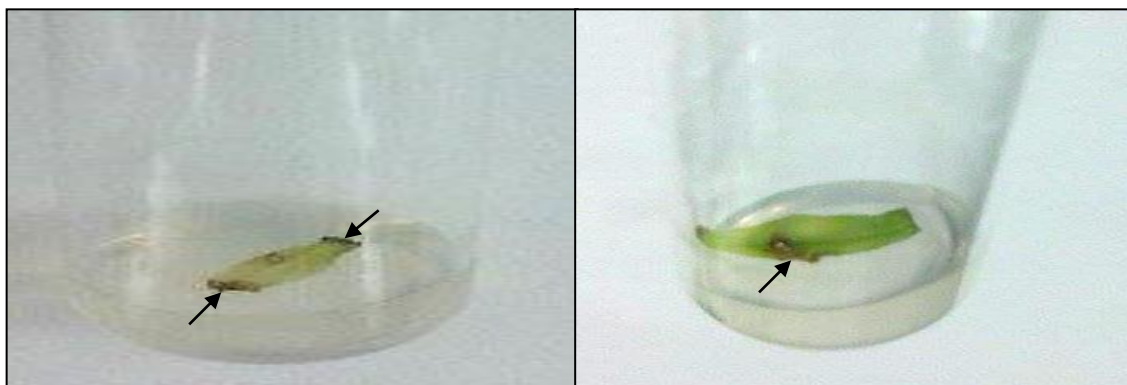


Fig.13 - Formação residual de *calli* em fragmentos foliares de GF677 no meio de cultura M2C0,5IA, após quatro semanas de cultura.

Uma vez que o processo de organogénese indireta é muito moroso comparativamente à via direta de regeneração *in vitro* (rebentação axilar), e que, entretanto, foram obtidos bons resultados de propagação de GF677 por esta via, não foram efetuados novos ensaios de organogénese indireta com outros meios de cultura.

3.1.3. Multiplicação *in vitro*

Após quatro semanas de cultura, os rebentos de GF677 obtidos na fase anterior foram transferidos para meio de multiplicação. Na fase de multiplicação *in vitro* de GF677 foram testados 14 meios de cultura (ver Quadro 8, página 67). A cada quatro a sete semanas foi feita a subcultura dos rebentos de GF677 para meio de cultura novo. No total foram feitas cerca de 10 repicagens dos rebentos de GF677 para meio de multiplicação. Em cada repicagem foi avaliada a taxa de contaminação, sobrevivência e multiplicação de cada clone. O objetivo destes 14 testes com diferentes formulações minerais (MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM), concentrações de BAP (0 mg/l, 0,1 mg/l, 0,5 mg/l e 1 mg/l), com e sem redução da concentração de mio-inositol (de 100 mg/l para 10 mg/l) e diferentes concentrações do agente gelificante (7 g/l, 6 g/l e 5 g/l) foi otimizar a composição do meio de cultura a utilizar na fase de multiplicação *in vitro* de GF677 (Gráfico 5).

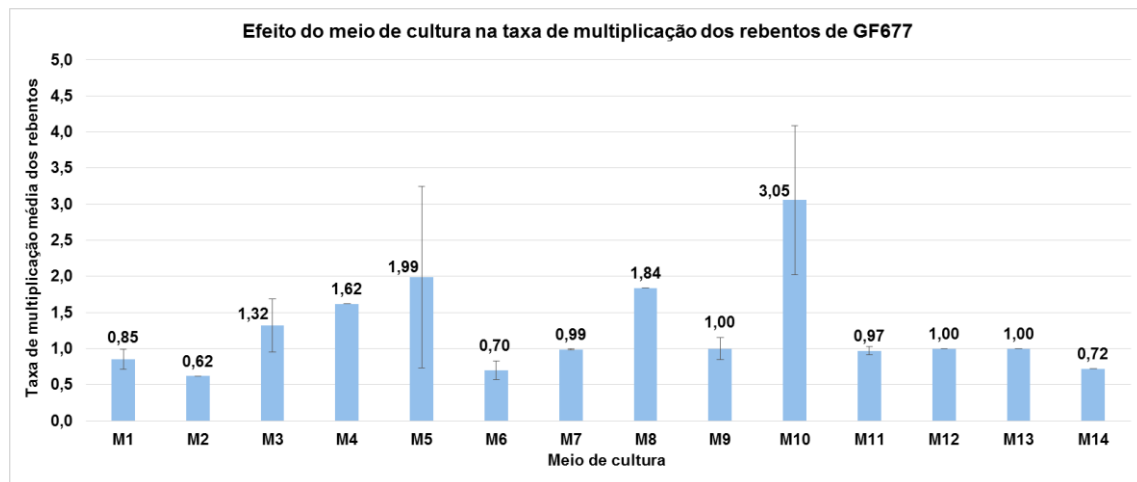


Gráfico 5 - Avaliação do efeito do meio de cultura na fase de multiplicação *in vitro* de GF677.

De acordo com os resultados obtidos anteriormente na fase de estabelecimento *in vitro*, optou-se por testar novamente o meio de estabelecimento M1 na fase de multiplicação *in vitro* de GF677 (meio de multiplicação M3).

Como se pode verificar através da análise do gráfico 5, o meio de cultura M3 demonstrou ser inadequado à fase de multiplicação *in vitro* de GF677, pois conduziu a uma baixa taxa de multiplicação média dos rebentos (1,32). Para além disso, os rebentos de GF677 formados apresentavam um pequeno comprimento médio (≤ 1 cm) e o formato de “roseta” (alargamento exagerado das folhas), após quatro semanas de cultura (Figura 14).



Fig.14 - Multiplicação *in vitro* de GF677 no meio de cultura M3, após quatro semanas de cultura.

Perante os resultados obtidos, testou-se um novo meio de cultura, o meio M5, com uma concentração de BAP cinco vezes superior à do meio M3. Como se pode verificar através da análise do gráfico 5, o meio de cultura M5 demonstrou ser mais adequado à fase de multiplicação *in vitro* de GF677 relativamente ao meio M3, pois conduziu a uma boa taxa de multiplicação média dos rebentos (1,99). Apesar de superior, a taxa de multiplicação média dos rebentos de GF677 obtida com o meio de cultura M5 não pareceu ser estatisticamente significativa comparativamente à obtida com o meio M3 (1,32), após quatro semanas de cultura. Para além disso, não se verificaram diferenças significativas ao nível do comprimento médio dos rebentos e no formato de “roseta” destes (Figura 15).

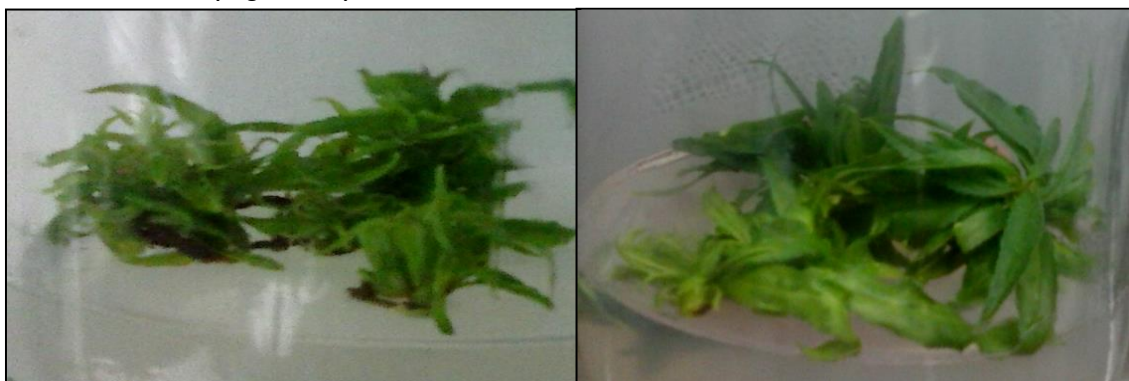


Fig.15 - Multiplicação *in vitro* de GF677 no meio de cultura M5, após quatro semanas de cultura.

Perante os resultados obtidos, foram testados outros meios de cultura de baixa concentração iónica, nomeadamente os meios M1 (meio MS), M9 (meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$) e M13 (meio WPM). Como se pode verificar através da análise do gráfico 5, os três meios de cultura demonstraram ser inapropriados a esta fase, uma vez que não se verificou a multiplicação dos rebentos de GF677 (taxas de multiplicação médias de 0,85; 1,00; 1,00, respetivamente). Para além disso, os explantes inoculados nestes meios apresentavam acentuadas cloroses foliares indicativas de fortes carências nutricionais, após quatro semanas de cultura.

Adicionalmente, os rebentos de GF677 formados não apresentavam diferenças significativas no formato de “roseta” e o aumento verificado no comprimento médio dos rebentos relativamente aos meios de cultura anteriores também não foi significativo (Figura 16).

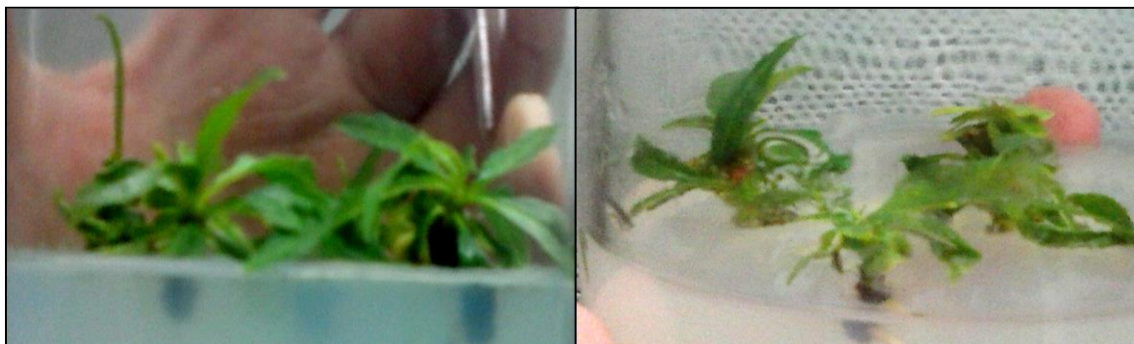


Fig.16 - Multiplicação *in vitro* de GF677 nos meios de cultura M9 e M13, respetivamente, após quatro semanas de cultura.

Perante os resultados obtidos, foram testados novamente dois dos meios de cultura de baixa concentração iónica apresentados anteriormente mas desta vez suplementados com BAP na concentração de 0,5 mg/l. Assim sendo, testou-se o meio de cultura M10, composto pelo meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$ e suplementado com BAP na concentração de 0,5 mg/l e o meio de cultura M14, composto pelo meio WPM suplementado com BAP na concentração de 0,5 mg/l.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 5, o meio de cultura M10 demonstrou ser adequado à fase de multiplicação *in vitro* de GF677, pois conduziu a uma elevada taxa de multiplicação média dos rebentos (3,05). Apesar de superior, a taxa de multiplicação média dos rebentos de GF677 obtida com o meio de cultura M10 não pareceu ser estatisticamente significativa comparativamente à obtida com o meio M5 (1,99), após quatro semanas de cultura. Adicionalmente, os rebentos de GF677 formados não apresentavam diferenças significativas relativamente ao seu comprimento médio e formato de “roseta” (Figura 17). Apesar disso, os rebentos de GF677 não repicados nos meios de cultura M5 e M10, após sete semanas de cultura apresentavam um elevado comprimento médio e uma taxa de multiplicação superior. Os elevados desvios-padrões obtidos relativamente às taxas de multiplicação médias dos rebentos de GF677, especialmente nestes meios de cultura, poderá estar associado ao facto do intervalo entre repicagens estar compreendido entre quatro a sete semanas.

Para além disso, os explantes inoculados no meio de cultura M10 apresentavam algumas cloroses foliares indicativas de carências nutricionais, contudo, muitíssimo menos acentuadas relativamente às observadas nos meios de cultura M1, M9 e M13, após quatro semanas de cultura.



Fig.17 - Multiplicação *in vitro* de GF677 nos meios de cultura M5 e M10, respetivamente, após quatro semanas de cultura.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 5, o meio de cultura M14 demonstrou ser inadequado a esta fase, uma vez que não se verificou a multiplicação dos rebentos de GF677 (taxa de multiplicação média de 0,72), após quatro semanas de cultura. Para além disso, os explantes inoculados neste meio apresentavam acentuadas cloroses foliares indicativas de fortes carências nutricionais, tal como verificado nos meios de cultura M1, M9 e M13 (Figura 18), após quatro semanas de cultura. Adicionalmente, os rebentos de GF677 apresentavam um pequeno comprimento médio e o formato de “roseta”.



Fig.18 - Multiplicação *in vitro* de GF677 no meio de cultura M14, após quatro semanas de cultura.

Finalmente, optou-se por testar um novo meio de cultura suplementado com o dobro da concentração de BAP relativamente aos meios de cultura que até então apresentavam as maiores taxas de multiplicação médias dos rebentos de GF677, isto é, os meios M5 (1,99) e M10 (3,05) (BAP na concentração de 0,5 mg/l). Nesse sentido, testou-se o meio de cultura M8, composto pelo meio MS com redução da concentração de mio-inositol para 10 mg/l e suplementado com BAP na concentração de 1 mg/l. Com este teste pretendeu-se também confirmar os resultados obtidos com esta concentração de BAP em ensaios efetuados anteriormente na Deifil (Deifil, resultados não publicados) e em Aghaye e Yadollahi (2012).

Como se pode verificar através da análise do gráfico 5, o meio de cultura M8 demonstrou ser menos adequado à fase de multiplicação *in vitro* de GF677 relativamente ao meio M5, pois conduziu a uma mais baixa taxa de multiplicação média dos rebentos (1,84). Apesar de inferior, a taxa de multiplicação média dos rebentos de GF677 obtida com o meio de cultura M8 não pareceu ser estatisticamente significativa comparativamente à obtida com o meio M5 (1,99), após quatro semanas de cultura. Para além disso, não se verificaram diferenças significativas ao nível do comprimento médio dos rebentos e no formato de “roseta” destes (Figura 19).



Fig.19 - Multiplicação *in vitro* de GF677 no meio de cultura M8, após quatro semanas de cultura.

De forma a determinar o efeito da redução da concentração de mio-inositol no meio de cultura MS na fase de multiplicação *in vitro* de GF677 (Gráfico 6), foram testados dois novos meios de cultura compostos pelo meio MS sem redução na concentração de mio-inositol (100 mg/l) e suplementados com as mesmas concentrações de BAP testadas anteriormente, nomeadamente, 0,1 mg/l e 0,5 mg/l (meios M2 e M4, respetivamente).

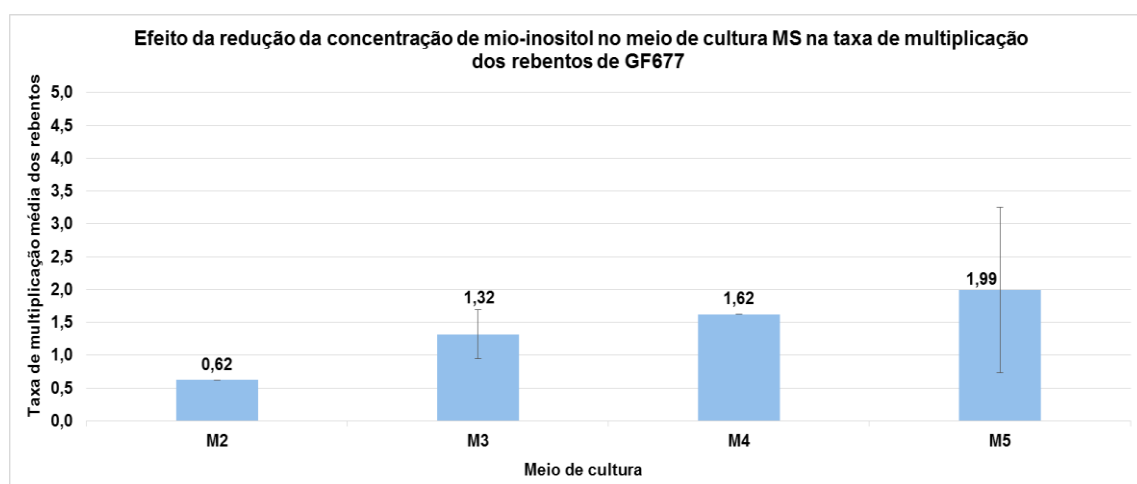


Gráfico 6 - Avaliação do efeito da redução da concentração de mio-inositol no meio de cultura MS na fase de multiplicação *in vitro* de GF677.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 6, os meios de cultura M2 e M4 sem redução da concentração de mio-inositol demonstraram ser inapropriados a esta fase, uma vez que não se verificou a multiplicação dos rebentos de GF677 no caso do meio de cultura M2 (taxa de multiplicação média de 0,62) ou no caso do meio de cultura M4 (taxa de multiplicação média de 1,62), a taxa de multiplicação média dos rebentos foi inferior à obtida no meio de cultura homólogo M5 com redução da concentração de mio-inositol, após quatro semanas de cultura. Contudo, o decréscimo verificado na taxa de multiplicação média dos rebentos de GF677 pareceu ser apenas estatisticamente significativo no caso do meio de cultura sem redução da concentração de mio-inositol e com a menor concentração de BAP testada, 0,1 mg/l (meio M2). Para além disso, não se verificaram diferenças significativas relativamente ao comprimento médio e formato de “roseta” dos rebentos de GF677 formados entre os meios de cultura com (meios M3 e M5) e sem (meios M2 e M4) redução da concentração de mio-inositol (Figura 20).

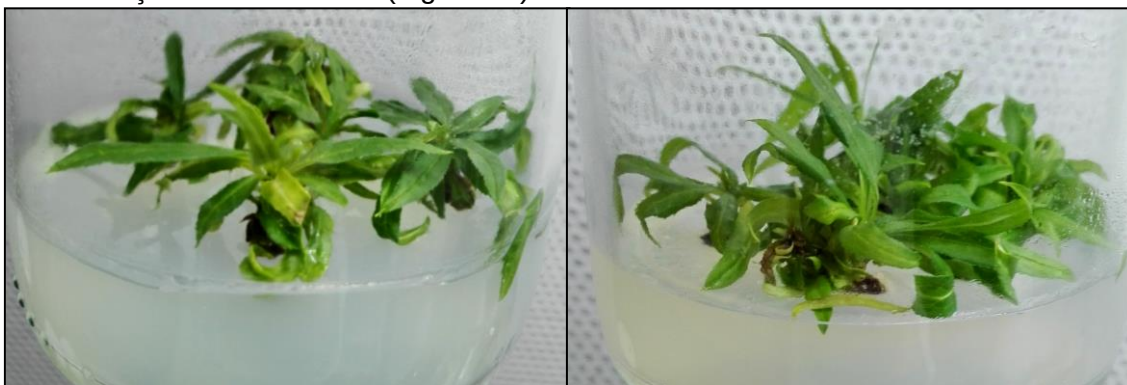


Fig.20 - Multiplicação *in vitro* de GF677 nos meios de cultura M2 e M4, respetivamente, após quatro semanas de cultura.

Os resultados obtidos relativamente às taxas de multiplicação médias dos rebentos demonstraram assim o efeito positivo da redução da concentração de mio-inositol no meio de cultura MS na fase de multiplicação *in vitro* de GF677. Contudo, não foram verificadas diferenças significativas relativamente ao comprimento médio e formato de “roseta” dos rebentos de GF677 formados entre os meios de cultura com e sem redução da concentração de mio-inositol, contrariamente ao sugerido por Aghaye e Yadollahi (2012) e Sepahvand *et al.* (2012). Para além disso, a redução da concentração de mio-inositol no meio de cultura MS pareceu apenas afetar significativamente e de forma positiva a taxa de multiplicação dos rebentos e consequentemente, a fase de multiplicação *in vitro* de GF677, quando a concentração de BAP no meio de cultura era muito baixa (meio M3). Dito de outro modo, foi possível verificar uma correlação negativa entre a concentração de BAP no meio de cultura e o

decréscimo da taxa de multiplicação média dos rebentos de GF677 verificado nos meios MS sem redução da concentração de mio-inositol.

No sentido de determinar o efeito da concentração do agente gelificante, neste caso agar, no meio de cultura na fase de multiplicação *in vitro* de GF677 (Gráfico 7) foram testados os meios de cultura que a data apresentavam uma maior taxa de multiplicação média dos rebentos de GF677 (meios M5 e M10), com redução da concentração de agar de 7 g/l para 6 g/l (meios M6 e M11, respetivamente) e 5 g/l (meios M7 e M12, respetivamente).

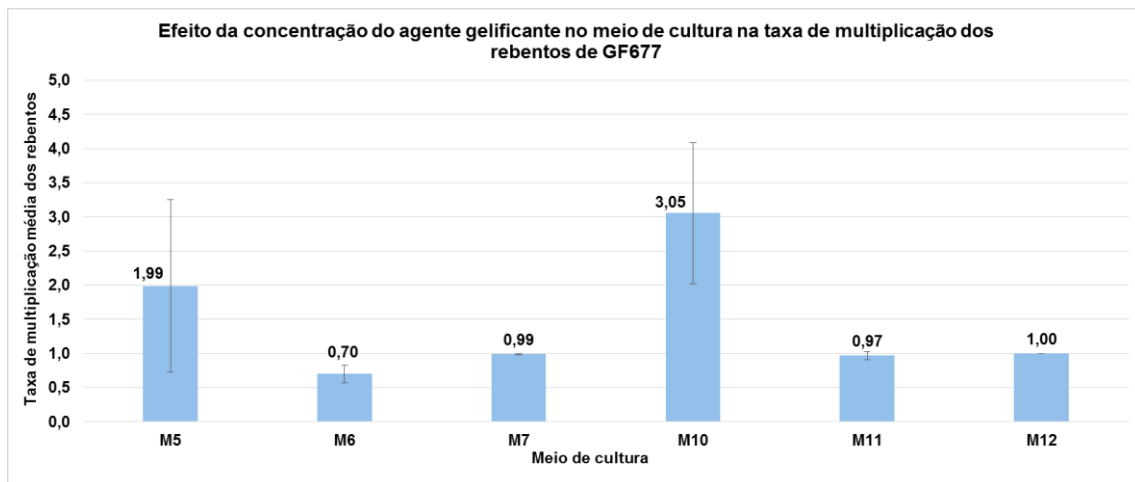


Gráfico 7 - Avaliação do efeito da concentração do agente gelificante no meio de cultura na fase de multiplicação *in vitro* de GF677.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 7, os meios de cultura M6 e M11 e M7 e M12 com redução da concentração do agente gelificante para 6 g/l e 5 g/l, respetivamente, demonstraram ser inapropriados a esta fase, uma vez que não se verificou a multiplicação dos rebentos de GF677 nestes meios (taxas de multiplicação médias de 0,70; 0,97 e 0,99; 1,00, respetivamente). Contudo, o decréscimo verificado na taxa de multiplicação média dos rebentos de GF677 pareceu ser apenas estatisticamente significativo no caso do meio de cultura M10 com redução da concentração do agente gelificante de 7 g/l para 6 g/l (meio M11) e 5 g/l (meio M12). Para além disso, não se verificaram diferenças significativas relativamente ao comprimento médio e formato de “roseta” dos rebentos de GF677 formados entre os meios de cultura com as diferentes concentrações do agente gelificante, após quatro semanas de cultura. Assim sendo, pode-se concluir que a redução da concentração do agente gelificante no meio de cultura pareceu afetar significativamente e de forma negativa a taxa de multiplicação dos rebentos e consequentemente, a fase de multiplicação *in vitro* de GF677. Este resultado pode ter que ver com o facto de nos meios de cultura com menor concentração do agente gelificante, os nutrientes se

encontrarem mais disponíveis para serem absorvidos pelos explantes de GF677, tornando-se tóxicos para estes.

Paques (1991) tinha já apontado a existência de uma forte relação entre a concentração do agente gelificante no meio de cultura, a taxa de multiplicação dos rebentos e a ocorrência de sintomas de vitrificação dos tecidos vegetais. Segundo Zimmerman (1995), normalmente os meios de cultura com uma maior concentração de agar apresentam uma menor ocorrência de sintomas vitrificação dos tecidos vegetais. Contudo, nestes casos a taxa de multiplicação dos rebentos podia ser drasticamente reduzida e consequentemente, a eficiência da propagação *in vitro*. Neste caso, os resultados obtidos confirmaram os resultados de Paques (1991), mas foram contrários aos apresentados por Zimmerman (1995), uma vez que a redução da taxa de multiplicação dos rebentos se verificou nos meios de cultura com uma menor concentração do agente gelificante.

Por último e perante todos os resultados obtidos, pode-se concluir que a composição do meio de cultura pareceu afetar significativamente a taxa de multiplicação dos rebentos e consequentemente, a fase de multiplicação *in vitro* de GF677. Concluindo, o meio de cultura mais adequado à fase de multiplicação *in vitro* de GF677 foi o meio de cultura M10, composto pelo meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$ e suplementado com BAP na concentração de 0,5 mg/l, pois conduziu à taxa de multiplicação média dos rebentos mais elevada (3,05). Apesar disso, o meio de cultura a utilizar na fase de multiplicação *in vitro* de GF677 deverá continuar a ser otimizado, pois os rebentos de GF677 formados no meio M10 apresentavam um pequeno comprimento médio e o formato de “roseta”. Para além disso, a taxa de multiplicação média dos rebentos de GF677 obtida com o meio de cultura M10 foi inferior à obtida por autores como Isikalan *et al.* (2008) e Sharifmoghaddam *et al.* (2011) que reportaram taxas de multiplicação dos rebentos de GF677 de 5,7 e 3,15, respetivamente. Assim sendo, futuramente dever-se-iam testar os meios de cultura utilizados por estes autores, isto é, o meio MS suplementado com BAP na concentração de 2 mg/l e o meio MS suplementado com BAP na concentração de 2 mg/l e IBA na concentração de 0,01 mg/l, respetivamente. Adicionalmente, dever-se-iam testar outros meios de cultura com a mesma formulação base do meio de cultura M10 (meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$) mas suplementados com concentrações de BAP superiores a 0,5 mg/l como em Isikalan *et al.* (2008), outras citocininas e/ou a combinação de uma citocinina e uma auxina como em Alanagh *et al.* (2010) e Sharifmoghaddam *et al.* (2011).

Para além da otimização da composição do meio de cultura na fase de multiplicação *in vitro*, seria também interessante testar futuramente outros períodos de subcultura dos

rebentos de GF677 mais longos, no sentido de determinar se o aumento temporal entre as repicagens afeta ou não significativamente a taxa de multiplicação dos rebentos, o seu comprimento médio e o formato de “roseta”.

Finalmente, com o objetivo de selecionar os melhores clones de GF677 para a propagação *in vitro* em grande escala, fez-se a avaliação comparativa das taxas de multiplicação médias dos 5 clones de GF677 obtidas nos dois melhores meios de cultura utilizados na fase de multiplicação *in vitro*, os meios M5 e M10 (Gráfico 8).

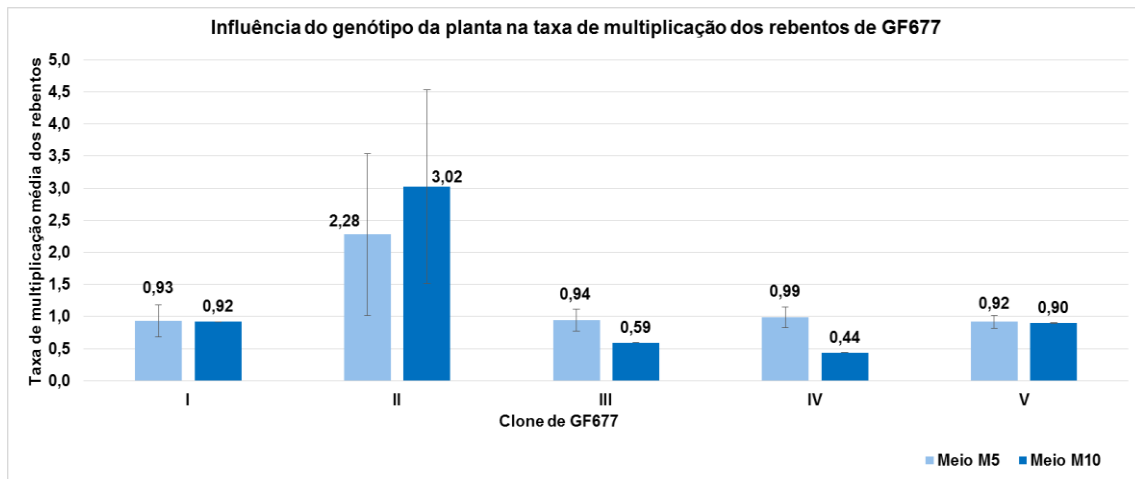


Gráfico 8 - Avaliação da influência do genótipo da planta na fase de multiplicação *in vitro* de GF677.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 8, pareceram existir diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas de multiplicação médias dos rebentos entre os 5 clones de GF677. O clone de GF677 que apresentou as maiores taxas de multiplicação médias dos rebentos em ambos os meios de cultura M5 e M10 foi o clone II. Contudo, a superioridade do clone II relativamente aos restantes clones apenas pareceu ser estatisticamente significativa no caso do meio de cultura M10. Assim sendo, pode-se concluir que o genótipo da planta pareceu influenciar claramente a taxa de multiplicação dos rebentos e por consequência, a fase de multiplicação *in vitro* de GF677. Deste modo, seria importante determinar futuramente se estes resultados se repetem ao nível das taxas de enraizamento *in vitro* e de aclimatização *ex vitro* (taxa de sobrevivência *ex vitro*). Caso este cenário se verifique, poder-se-á optar por micropropagar exclusivamente o clone II de GF677.

3.1.4. Enraizamento *in vitro*

Após quatro semanas de cultura, os rebentos de GF677 obtidos na fase anterior, com 2 a 3 cm de comprimento, foram transferidos para meio de enraizamento. Na fase de enraizamento *in vitro* de GF677 foram testados 8 meios de cultura (ver Quadro 9, página 70). Após quatro semanas de cultura, foi avaliada a taxa de enraizamento, o

número de raízes por plântula, o seu comprimento médio e diâmetro em cada meio de cultura. O objetivo destes 8 testes com diferentes formulações minerais ($\frac{1}{2}$ MS e MS com redução da concentração dos macronutrientes nitrato de potássio (KNO_3) e nitrato de amónia (NH_4NO_3) para $\frac{1}{2}$) e diferentes concentrações de IBA (0 mg/l, 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,5 mg/l e 1 mg/l) foi otimizar a composição do meio de cultura a utilizar na fase de enraizamento *in vitro* de GF677 (Gráfico 9). Os testes de enraizamento foram efetuados apenas com o clone II de GF677 por este ser o clone com o maior número de explantes disponível e com o qual era espectável obter melhores resultados.

Segundo vários autores, o IBA é a auxina que mais eficazmente promove a formação de raízes adventícias em GF677 (Spethmann e Hamzah, 1988; Riov, 1993; De Klerk *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 2004; Alanagh *et al.*, 2010). Vaez-Livari e Salehi-Soghadi (2005) recomendavam a utilização de IBA na concentração de 5 mg/l para a indução do enraizamento em GF677. Já Sharifmoghaddam *et al.* (2011) obtiveram os melhores resultados de enraizamento com a adição ao meio MS de IBA na concentração de 0,5 mg/l. Mais recentemente, Aghaye e Yadollahi (2012) indicavam que o enraizamento de GF677 era favorecido pela adição ao meio $\frac{1}{2}$ MS de IBA na concentração de 3 mg/l, conduzindo à maior taxa de enraizamento (44%), bem como ao maior número (2,2 raízes por explante) e comprimento médios das raízes formadas (11,2 cm). De acordo com Alanagh *et al.* (2010), a maior taxa de enraizamento (44%) foi obtida em meio GNH suplementado com IBA na concentração de 2 mg/l.

Para além da concentração de IBA no meio de cultura, vários autores referem que fatores como o fotoperíodo, a intensidade luminosa e a qualidade da luz (comprimento de onda) também afetam o enraizamento de GF677 (Caboni *et al.*, 1997; Kamali *et al.*, 2001; Channuntapipat *et al.*, 2003; Antonopoulou *et al.*, 2004; Vaez-Livari e Salehi-Soghadi, 2005; Aghaye e Yadollahi, 2012). De acordo com Payghamzadeh e Kazemitabar (2011), a condição de escuro essencial para a indução da rizogénese pode ser mimetizada pela adição de carvão ativado ao meio de enraizamento.

Na fase anterior, o meio de multiplicação M9, composto pelo meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$, induziu a formação de raízes (rizogénese) em alguns rebentos de GF677, após quatro semanas de cultura. Perante este resultado, testou-se novamente este meio de cultura na fase de enraizamento *in vitro* de GF677 (meio de enraizamento M1). Este meio de cultura serviu de controlo a outros três meios testados nesta fase e apresentados de seguida (meios M2, M3 e M4). De forma a determinar o efeito do carvão ativado na fase de enraizamento *in vitro* de GF677, testou-se o meio de cultura M2, composto pelo meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$ e suplementado com carvão ativado na concentração de 1 g/l. Adicionalmente, no sentido de determinar o efeito da auxina IBA na fase de

enraizamento *in vitro* de GF677, foram testados os meios de cultura M3 e M4, compostos pelo meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$ e suplementados com IBA na concentração de 0,1 mg/l e 0,2 mg/l, respetivamente.

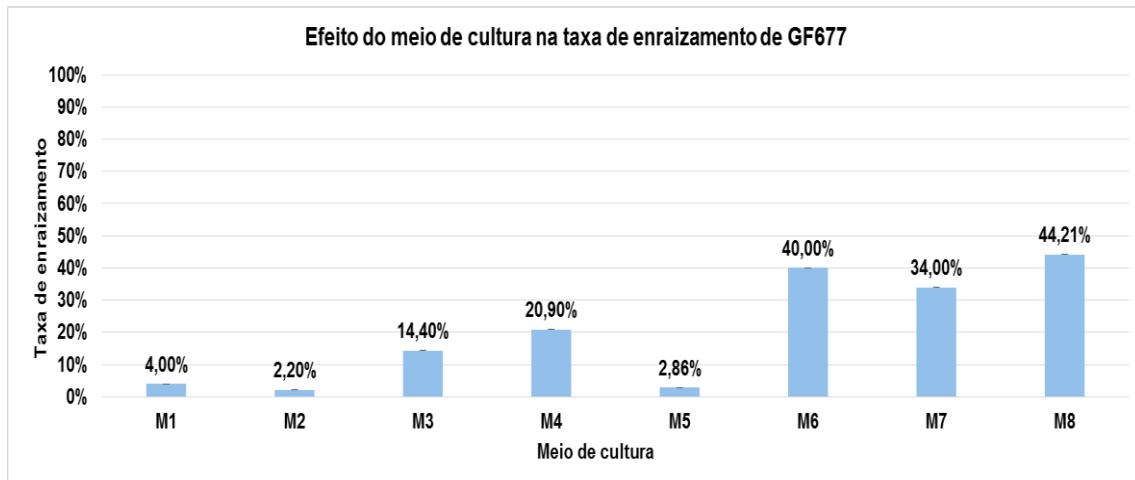


Gráfico 9 - Avaliação do efeito do meio de cultura na fase de enraizamento *in vitro* do clone II de GF677.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 9, os primeiros quatro meios de cultura testados demonstraram ser inadequados à fase de enraizamento *in vitro* de GF677, pois conduziram a baixas taxas de enraizamento dos explantes. Contudo, pareceram existir diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas de enraizamento dos explantes de GF677 entre os quatro meios de cultura testados. Após quatro semanas de cultura, obteve-se uma taxa de enraizamento de GF677 com o meio de cultura M1 (controlo) de 4,00%. No caso do meio de cultura M2, obteve-se uma taxa de enraizamento inferior ao controlo de apenas 2,20%. Este resultado é contrário ao sugerido por Payghamzadeh e Kazemitabar (2011), que apontavam um efeito positivo do carvão ativado no enraizamento *in vitro*. Relativamente aos meios de cultura com IBA, foram obtidas taxas de enraizamento de GF677 substancialmente superiores ao controlo, nomeadamente de 14,40% no caso do meio de cultura M3 e de 20,90% no caso do meio de cultura M4. Perante os resultados obtidos relativamente às taxas de enraizamento de GF677, foi possível concluir que o carvão ativado por si só, isto é, na ausência de auxina no meio de cultura (meio M2) não apresenta um efeito positivo ou promotor do enraizamento de GF677, uma vez que conduziu a uma taxa de enraizamento muitíssimo baixa (2,20%). No caso dos meios suplementados com IBA, em ambas as concentrações testadas (0,1 e 0,2 mg/l), verificou-se um aumento substancial da taxa de enraizamento de GF677 relativamente ao controlo, o que demonstra o efeito positivo desta auxina no enraizamento *in vitro* de GF677.

Perante os resultados obtidos relativamente às taxas de enraizamento e qualidade das plântulas com estes meios de cultura, optou-se por testar novos meios de

enraizamento cuja formulação base não tivesse uma concentração iónica tão baixa de modo a evitar as cloroses foliares verificadas nas plântulas de GF677 e aumentar as taxas de enraizamento. De acordo com Payghamzadeh e Kazemitabar (2011), o decréscimo na concentração dos macronutrientes nitrato de potássio (KNO_3) e nitrato de amónia (NH_4NO_3) conduz por si só ao aumento da taxa de enraizamento. Assim sendo, testou-se o meio de cultura M5, composto pelo meio MS com redução da concentração dos macronutrientes nitrato de potássio (KNO_3) e de nitrato de amónia (NH_4NO_3) para $\frac{1}{2}$. Este meio de cultura serviu de controlo a outros três meios testados nesta fase e apresentados de seguida (meios M6, M7 e M8). Tendo em conta que o meio de cultura M4, composto pelo meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$ e suplementado com IBA na concentração 0,2 mg/l conduziu anteriormente à maior taxa de enraizamento das plântulas de GF677 (20,9%), ao maior número de raízes por plântula e a raízes mais espessas e resistentes, optou-se por testar novamente esta concentração da auxina e outras duas concentrações mais elevadas de 0,5 mg/l e de 1 mg/l. Desta forma, foram testados os três meios de cultura M6, M7 e M8, compostos pelo meio MS com redução da concentração dos macronutrientes nitrato de potássio (KNO_3) e nitrato de amónia (NH_4NO_3) para $\frac{1}{2}$ e suplementados com IBA na concentração de 0,2 mg/l, 0,5 mg/l e 1 mg/l, respetivamente.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 9, os últimos quatro meios de cultura testados demonstraram ser mais adequados à fase de enraizamento *in vitro* de GF677 comparativamente aos meios anteriores, pois conduziram a taxas de enraizamento dos explantes superiores. Contudo, pareceram existir diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas de enraizamento dos explantes de GF677 entre os últimos quatro meios de cultura testados. Após quatro semanas de cultura, obteve-se uma taxa de enraizamento de GF677 com o meio de cultura M5 (controlo) de 2,86%. Relativamente aos meios de cultura com IBA, foram obtidas taxas de enraizamento de GF677 substancialmente superiores relativamente ao controlo, nomeadamente de 40,00% no caso do meio de cultura M6, de 34,00% no caso do meio de cultura M7 e finalmente, de 44,21% no caso do meio de cultura M8. Perante os resultados obtidos relativamente às taxas de enraizamento de GF677, foi possível concluir que a redução da concentração dos macronutrientes nitrato de potássio (KNO_3) e nitrato de amónia (NH_4NO_3) para $\frac{1}{2}$ por si só, isto é, na ausência de auxina no meio de cultura (meio M5) não apresenta um efeito positivo ou promotor do enraizamento de GF677, uma vez que conduziu a uma taxa de enraizamento muitíssimo baixa (2,86%). No caso dos meios suplementados com IBA, nas três concentrações testadas (0,2 mg/l, 0,5 mg/l e 1 mg/l) verificou-se um aumento substancial da taxa de enraizamento de GF677 relativamente ao controlo, o que

demonstra novamente o efeito positivo desta auxina no enraizamento *in vitro* de GF677. Para além disso, a maior taxa de enraizamento de GF677 verificou-se com o meio de cultura suplementado com a maior concentração de IBA testada, isto é, 1 mg/l, o que demonstra tal como anteriormente uma correlação positiva entre a concentração de IBA no meio de cultura e a taxa de enraizamento de GF677. Contudo, esta correlação positiva não foi proporcional, pois não se verificou o dobro da taxa de enraizamento de GF677 com o meio de cultura M4, suplementado com IBA na concentração de 0,2 mg/l (20,90%) comparativamente ao meio de cultura M3, suplementado com IBA na concentração de 0,1 mg/l (14,40%). Da mesma forma, não se verificou o dobro da taxa de enraizamento de GF677 com o meio de cultura M8, suplementado com IBA na concentração de 1 mg/l (44,21%) comparativamente ao meio de cultura M7, suplementado com IBA na concentração de 0,5 mg/l (34,00%). Com o meio de cultura M8 foi obtida uma taxa de enraizamento de GF677 (44,21%) similar à obtida em Aghaye e Yadollahi (2012) e Alanagh *et al.* (2010), contudo, estes autores haviam utilizado o triplo e o dobro da concentração de IBA, respetivamente. Para além disso, este resultado também pode ter sido influenciado pela redução da concentração dos macronutrientes nitrato de amónio e nitrato de potássio no meio MS, pela pureza do IBA utilizado ou mesmo pelo genótipo das plantas.

Para além da taxa de enraizamento de GF677, foram também avaliadas outras características importantes como o número de raízes por plântula, o seu comprimento médio e diâmetro em cada meio de cultura, bem como a formação de *calli* após quatro semanas de cultura.

No caso do meio de cultura M1 (controlo), as plântulas de GF677 apresentavam-se maioritariamente verdes, apesar da existência de algumas cloroses foliares indicativas de carências nutricionais. Adicionalmente, as raízes formadas eram raízes únicas (Quadro 10 e Figura 21), de elevado comprimento médio e de diâmetro normal. Adicionalmente, verificou-se alguma formação de *calli*.



Fig.21 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M1, após quatro semanas de cultura.

No caso do meio de cultura M2, não se verificou qualquer formação de *calli* e as pouquíssimas raízes formadas eram raízes únicas (Quadro 10 e Figura 22), de elevado comprimento médio e de pequeno diâmetro ou então microrraízes. Contudo, as plântulas de GF677 apresentavam-se ligeiramente mais verdes e robustas comparativamente ao controlo.



Fig.22 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M2, após quatro semanas de cultura.

No caso dos meios de cultura M3 e M4, as plântulas de GF677 apresentavam cloroses foliares bastante mais acentuadas relativamente ao controlo, possivelmente relacionadas com a presença da auxina IBA no meio. No caso do meio de cultura M3, apesar das raízes formadas apresentarem um comprimento médio inferior ao controlo, tinham um maior diâmetro e cada plântula continha uma ou mais raízes (Quadro 10 e Figura 23). Adicionalmente, verificou-se uma maior formação de *calli* relativamente ao controlo.



Fig.23 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M3, após quatro semanas de cultura.

No caso do meio de cultura M4, apesar das raízes formadas apresentarem um comprimento médio inferior relativamente ao controlo e ao meio de cultura M3, as raízes apresentavam um elevado diâmetro e cada plântula continha uma ou mais raízes (Quadro 10 e Figura 24). Adicionalmente, verificou-se uma maior formação de *calli* relativamente ao controlo.



Fig.24 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M4, após quatro semanas de cultura.

No caso do meio de cultura M5 (controlo), as plântulas de GF677 apresentavam-se maioritariamente verdes, apesar da existência de algumas cloroses foliares. Adicionalmente, as raízes formadas eram raízes únicas (Quadro 10 e Figura 25), de pequeno comprimento médio e de diâmetro normal. Adicionalmente, verificou-se também alguma formação de *calli*.



Fig.25 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M5, após quatro semanas de cultura.

No caso do meio de cultura M6, as plântulas de GF677 apresentavam-se também maioritariamente verdes, apesar da existência de algumas cloroses foliares. As raízes formadas apresentavam um elevado comprimento médio e um maior diâmetro comparativamente ao controlo. Cada plântula continha uma ou mais raízes (Quadro 10 e Figura 26). Adicionalmente, verificou-se uma maior formação de *calli* relativamente ao controlo.



Fig.26 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M6, após quatro semanas de cultura.

No caso do meio de cultura M7, as plântulas de GF677 apresentavam-se igualmente maioritariamente verdes, apesar da existência de algumas cloroses foliares. As raízes formadas apresentavam igualmente um maior diâmetro relativamente ao controlo, contudo, apresentavam um menor comprimento médio relativamente ao meio de cultura M6. Cada plântula continha uma ou mais raízes (Quadro 10 e Figura 27). Adicionalmente, verificou-se uma maior formação de *calli* relativamente ao controlo.

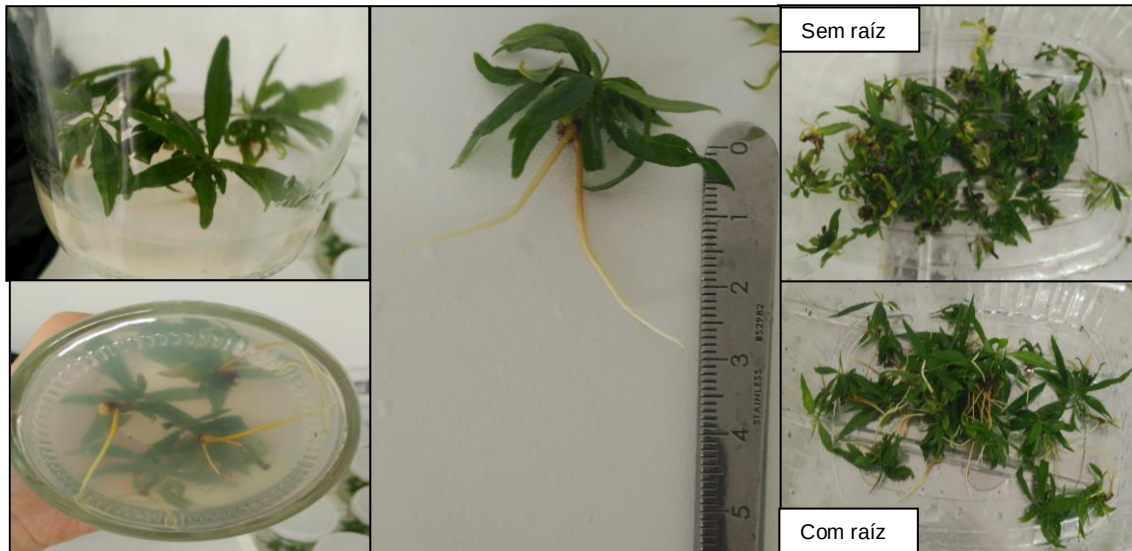


Fig.27 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M7, após quatro semanas de cultura.

Finalmente no caso do meio de cultura M8, as plântulas de GF677 apresentavam-se também maioritariamente verdes, apesar da existência de algumas cloroses foliares. As raízes apresentavam igualmente um maior diâmetro relativamente ao controlo, contudo, apresentavam um menor comprimento médio relativamente ao meio de cultura M7. Cada plântula continha uma ou mais raízes (Quadro 10 e Figura 28). Adicionalmente, verificou-se uma maior formação de *calli* relativamente ao controlo.



Fig.28 - Plântulas de GF677 no meio de enraizamento M8, após quatro semanas de cultura.

Perante os resultados obtidos relativamente ao comprimento médio das raízes formadas, foi possível verificar uma correlação negativa entre a concentração de IBA no meio de cultura e o comprimento médio das raízes formadas. Contudo, esta correlação negativa não foi proporcional, pois não se verificou a redução para metade do comprimento médio das raízes formadas no meio de cultura M4, suplementado com IBA na concentração de 0,2 mg/l, relativamente ao meio de cultura M3,

suplementado com IBA na concentração de 0,1 mg/l. Da mesma forma, não se verificou a redução para metade do comprimento médio das raízes formadas no meio de cultura M8, suplementado com IBA na concentração de 1 mg/l, relativamente ao meio de cultura M7, suplementado com IBA na concentração de 0,5 mg/l.

Para além disso, verificou-se que as raízes formadas nos meios de cultura suplementados com IBA apresentavam um maior diâmetro relativamente aos respetivos controlos, o que demonstra o efeito positivo desta auxina no enraizamento *in vitro* de GF677.

Quadro 10 - Avaliação do efeito do meio de cultura e da concentração de IBA no número de raízes por plântula na fase de enraizamento *in vitro* de GF677.

Meio de cultura	1 raíz	2-5 raízes	≥ 5 raízes
M1	4 Plântulas		
M2	2 Plântulas		
M3	9 Plântulas	4 Plântulas	
M4	9 Plântulas	8 Plântulas	1 Plântulas
M5	3 Plântulas		
M6	25 Plântulas	10 Plântulas	5 Plântulas
M7	13 Plântulas	15 Plântulas	6 Plântulas
M8	15 Plântulas	13 Plântulas	12 Plântulas

Os resultados apresentados no quadro acima apontam para uma correlação positiva entre a concentração de IBA no meio de cultura e o número de raízes por plântula de GF677, o que demonstra novamente o efeito positivo desta auxina no enraizamento *in vitro* de GF677. Todavia, esta correlação positiva não foi proporcional, pois não se verificou o dobro do número de raízes por plântula no meio de cultura M4, suplementado com IBA na concentração de 0,2 mg/l, relativamente ao meio de cultura M3, suplementado com IBA na concentração de 0,1 mg/l. Da mesma forma, não se verificou o dobro do número de raízes por plântula no meio de cultura M8, suplementado com IBA na concentração de 1 mg/l, relativamente ao meio de cultura M7, suplementado com IBA na concentração de 0,5 mg/l.

Perante os resultados obtidos, pode-se concluir que o meio de cultura pareceu afetar significativamente a taxa de enraizamento dos explantes, o número de raízes por plântula, o seu comprimento médio e o diâmetro e consequentemente, a fase de enraizamento *in vitro* de GF677. Concluindo, o meio de cultura mais adequado à fase de enraizamento *in vitro* de GF677 foi o meio de cultura M8, composto pelo meio MS com redução da concentração dos macronutrientes nitrato de potássio (KNO₃) e nitrato

de amónia (NH_4NO_3) para $\frac{1}{2}$ e suplementado com IBA na concentração de 1 mg/l, pois conduziu à taxa de enraizamento dos explantes mais elevada (44,21%), a um elevado número de raízes por plântula, a raízes de elevado diâmetro e com um pequeno comprimento médio, o que facilita a aclimatização *ex vitro* destas plântulas. Apesar disso, o meio de cultura a utilizar na fase de enraizamento *in vitro* de GF677 deverá continuar a ser otimizado, de forma a obter uma taxa de enraizamento de GF677 próxima de 100%. Assim sendo, futuramente dever-se-iam testar novos meios de cultura com a mesma formulação base do meio de cultura M8 (meio MS com redução da concentração dos macronutrientes nitrato de potássio e nitrato de amónia para $\frac{1}{2}$) mas suplementados com concentrações de BAP superiores a 1 mg/l como em Vaez-Livari e Salehi-Soghadi (2005), outras citocininas e/ou a combinação de uma citocinina e uma auxina. Para além disso, dever-se-ia igualmente testar o meio sugerido por Sepahvand *et al.* (2012, composto pelo meio LS suplementado com tiamina na concentração de 1,6 mg/l e IBA na concentração de 1,3 mg/l e com o qual estes autores obtiveram uma taxa de enraizamento de GF677 de 100%.

3.1.5. Aclimatização *ex vitro*

Após quatro semanas de cultura no meio de enraizamento, foi feita a aclimatização *ex vitro* das plântulas de GF677. Nesta fase, as plântulas de GF677 enraizadas e não enraizadas foram lavadas com água corrente para a remoção do meio de cultura de enraizamento das plântulas e das raízes (Figura 29). O objetivo destes 2 testes com plântulas com e sem raiz foi determinar o efeito da presença/ausência de raiz nas plântulas na fase de aclimatização *ex vitro* de GF677 (Gráfico 10).



Fig.29 - Lavagem das plântulas do clone II de GF677 antes da aclimatização *ex vitro*.

Posteriormente, as plântulas de GF677 com raiz foram colocadas em caixas com uma mistura de turfa (Turfa média Bor na Móna®) e perlite na proporção de 1:1 (v/v). Por outro lado, as plântulas de GF677 sem raiz foram tratadas com o produto Clonex®. O Clonex® é um produto comercial com IBA na concentração de 3 g/l e que promove

alegadamente o enraizamento *ex vitro* das plântulas. No caso das plântulas de GF677 sem raíz foram testados 2 substratos diferentes, nomeadamente uma mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1 (v/v) e o substrato VECO3 (Jiffy Preformas®). O objetivo destes 2 testes com diferentes substratos (mistura de turfa e perlite e VECO3) foi otimizar a composição do substrato a utilizar na fase de aclimatização *ex vitro* de GF677 (Gráfico 11).

Finalmente, as plântulas de GF677 foram cobertas com uma tela de polietileno transparente e colocadas num estufim no interior da estufa, com uma humidade relativa superior a 90% e à temperatura ambiente (não controlada) (Figura 30). A humidade relativa do ar foi gradualmente reduzida até 60% e as plântulas regadas semanalmente. A abertura de furos na tela foi feita gradualmente a cada 2 dias e sua remoção total ocorreu após 5 semanas. Após quatro semanas, foi avaliada a taxa de aclimatização *ex vitro* (taxa de sobrevivência *ex vitro*) e o crescimento das plântulas aclimatizadas. Este teste de aclimatização *ex vitro* foi efetuado apenas com o clone II de GF677 por este ser o clone com o maior número de explantes disponível e com o qual era espectável obter melhores resultados. O teste teve lugar em maio de 2017. Foi realizado um segundo teste de aclimatização *ex vitro* em junho de 2017, mais uma vez exclusivamente com o clone II de GF677, em que se testou um terceiro substrato correspondente a turfa a 100% nas plântulas com e sem raíz. Contudo, os resultados deste segundo teste não foram obtidos em tempo útil, pelo que não foram incluídos neste relatório.

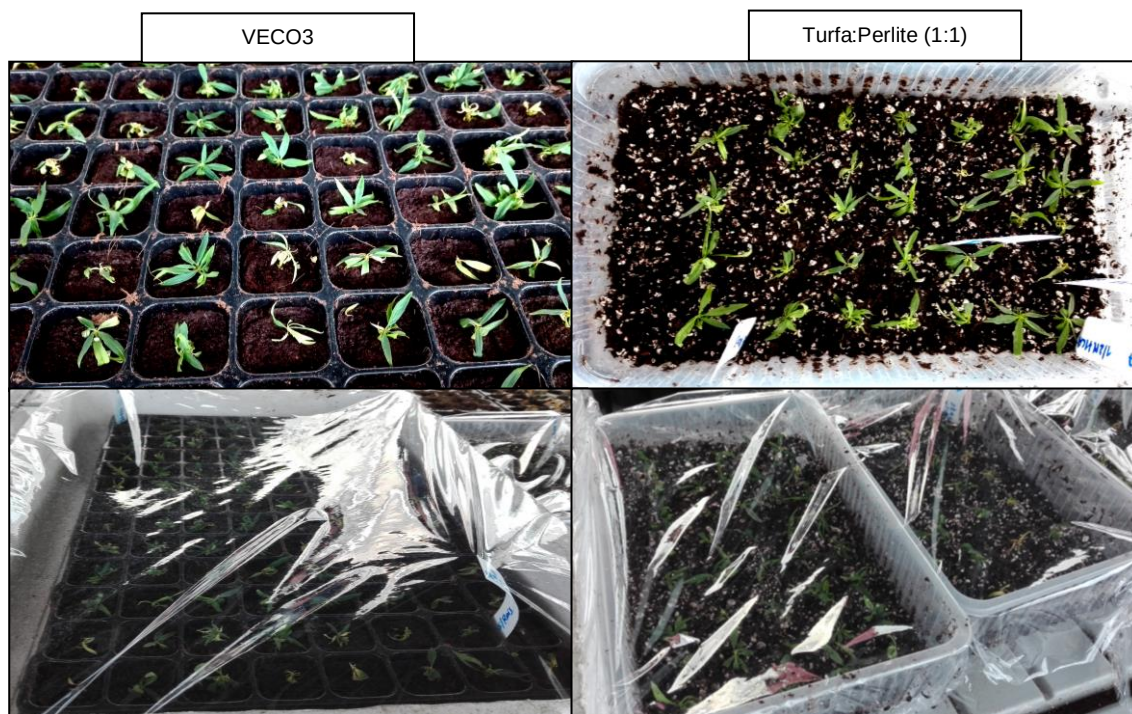


Fig.30 - Aclimatização *ex vitro* na estufa das plântulas do clone II de GF677 num tabuleiro alveolar com o substrato VECO3 e em caixas com uma mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1 (v/v), respetivamente (Dia 0).

Relativamente à fase de aclimatização *ex vitro*, segundo Alanagh *et al.* (2010) e Nezami *et al.* (2014) após a lavagem com água corrente das raízes das plântulas para a remoção do meio de cultura, estas deviam ser colocadas num tabuleiro alveolar com uma mistura de turfa e perlite na proporção de 1:3 (v/v), cobertas com uma tela de polietileno transparente (1 semana) e incubadas numa câmara de cultura com humidade relativa de 96%, fotoperíodo de 16/8 horas, intensidade luminosa de 60 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. A humidade da câmara de cultura devia ser gradualmente reduzida até 60% e as plântulas regadas semanalmente. Após quatro a cinco semanas, as plântulas deviam ser transferidas para as condições de estufa. Após 2 meses, tanto Alanagh *et al.* (2010) como Nezami *et al.* (2014) obtiveram taxas de aclimatização *ex vitro* de 90% e as plântulas de GF677 apresentavam entre 20 a 30 cm e 15 a 25 cm de altura, respetivamente.

Avaliou-se o efeito da presença/ausência de raiz nas plântulas na fase de aclimatização *ex vitro* de GF677 (Gráfico 10).

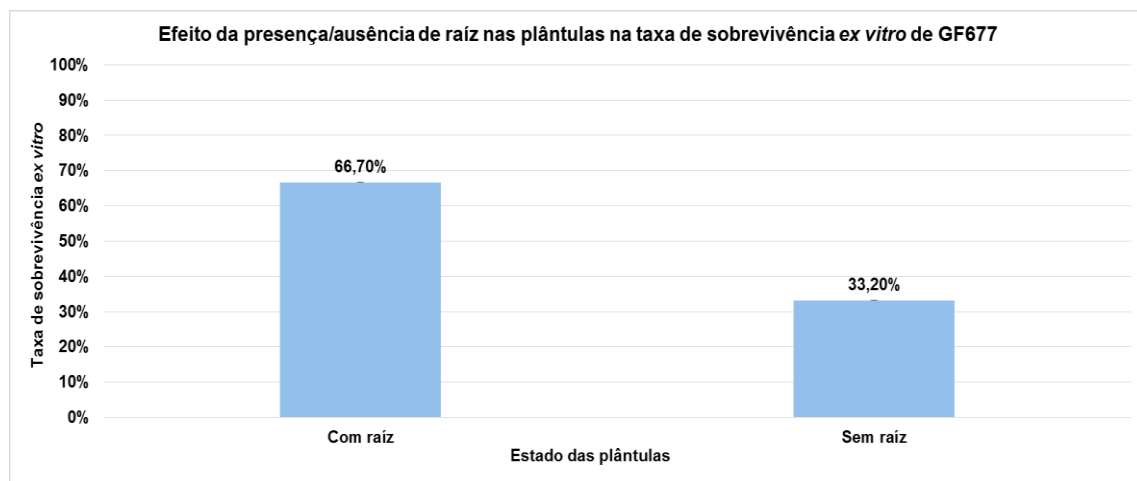


Gráfico 10 - Avaliação do efeito da presença/ausência de raiz nas plântulas na fase de aclimatização *ex vitro* do clone II de GF677.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 10, obtiveram-se boas taxas de sobrevivência *ex vitro* tanto no caso das plântulas de GF677 com raiz como sem raiz. Contudo, pareceram existir diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas de sobrevivência *ex vitro* entre as plântulas com e sem raiz. No caso das plântulas de GF677 com raiz obteve-se uma taxa de sobrevivência *ex vitro* de 66,70% e algum crescimento das plântulas, após quatro semanas de aclimatização *ex vitro* na estufa (Figura 31).

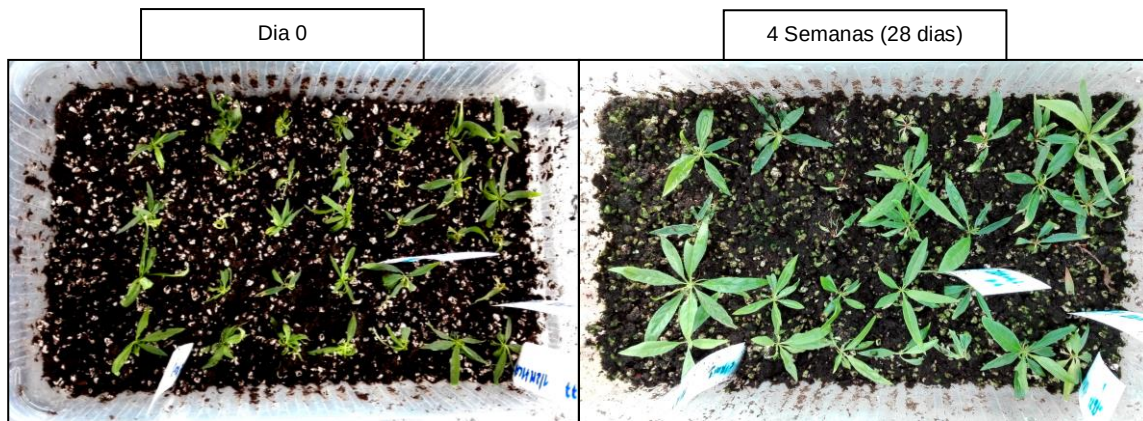


Fig.31 - Plântulas do clone II de GF677 com raiz, após 0 e 4 semanas (28 dias) de aclimatização *ex vitro* na estufa.

Finalmente, no caso das plântulas de GF677 sem raiz verificou-se uma taxa de sobrevivência *ex vitro* obviamente menor de 33,20% e um reduzido crescimento das plântulas, após quatro semanas de aclimatização *ex vitro* na estufa (Figura 32).

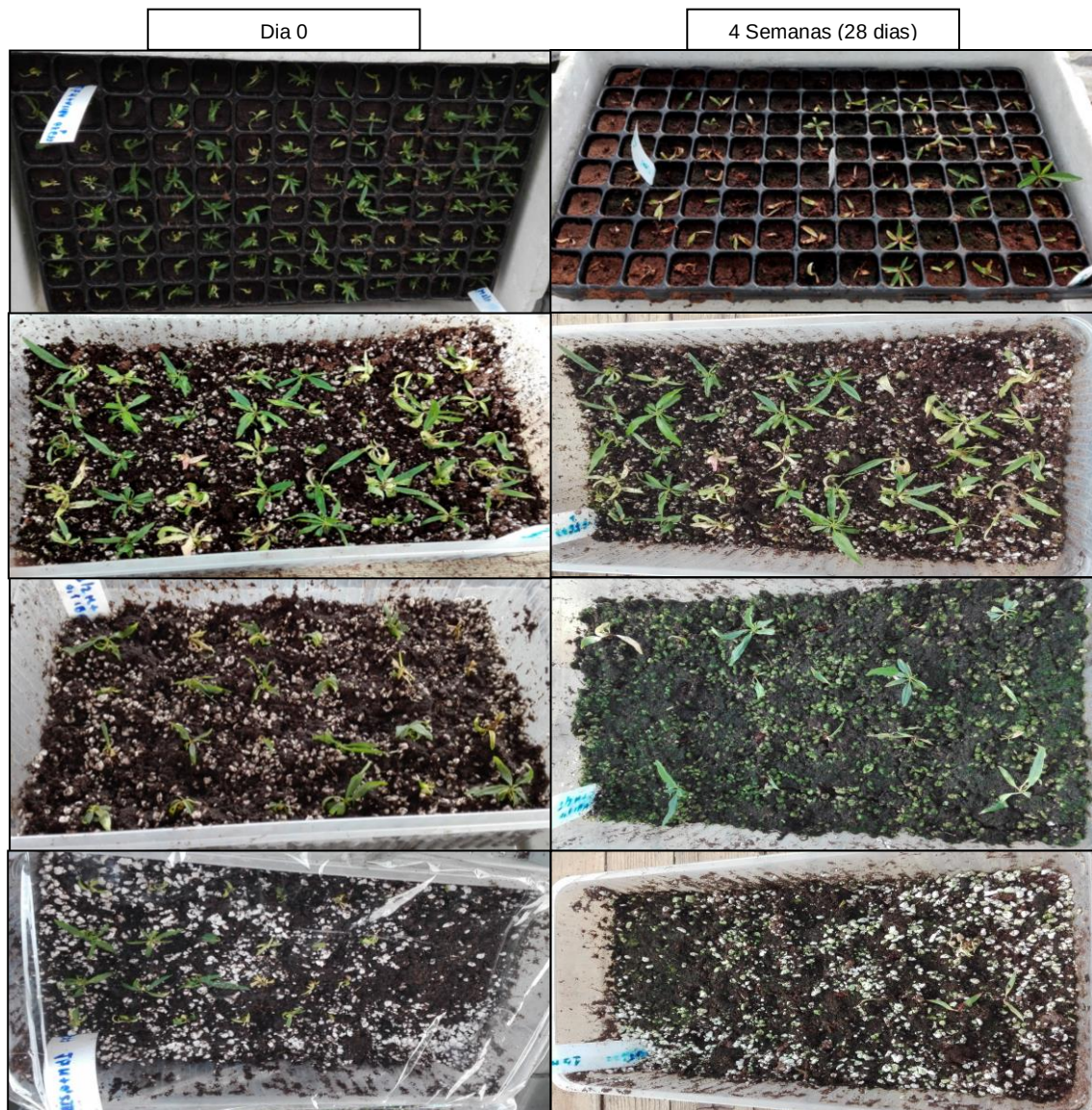


Fig.32 - Plântulas do clone II de GF677 sem raiz, após 0 e 4 semanas (28 dias) de aclimatização *ex vitro* na estufa.

Desta forma, pode-se concluir que a presença/ausência de raiz nas plântulas pareceu afetar significativamente a sua taxa de sobrevivência *ex vitro* e consequentemente, a fase de aclimatização *ex vitro* de GF677. A taxa de sobrevivência *ex vitro* das plântulas de GF677 com raiz (66,70%) foi o dobro da taxa de sobrevivência *ex vitro* das plântulas sem raiz (33,20%). Estas taxas de sobrevivência *ex vitro* das plântulas de GF677 foram inferiores às apresentadas por Alanagh *et al.* (2010) e Nezami *et al.* (2014), que obtiveram após 2 meses taxas de sobrevivência *ex vitro* de 90% e plântulas com 20 a 30 cm e 15 a 25 cm de altura, respetivamente. Estes autores obtiveram melhores resultados na fase de aclimatização *ex vitro* de GF677 devido ao maior rigor no controlo das condições climáticas, em especial da temperatura. Finalmente, avaliou-se o efeito do substrato na fase de aclimatização *ex vitro* de GF677 (Gráfico 11).

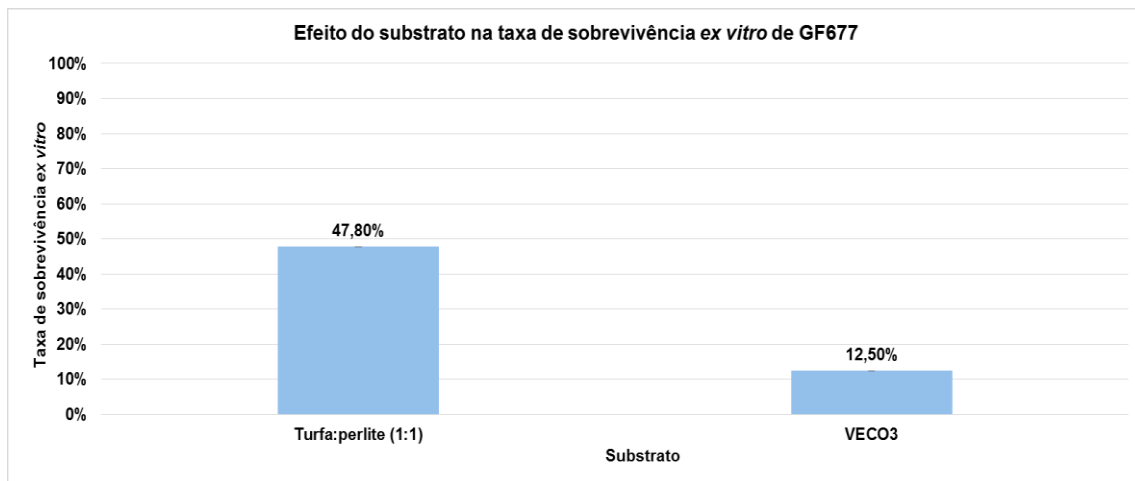


Gráfico 11 - Avaliação do efeito do substrato na fase de aclimatização *ex vitro* do clone II de GF677.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 11, pareceram existir diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas de sobrevivência *ex vitro* das plântulas de GF677 entre os dois substratos testados. Com o substrato composto por uma mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1 (v/v) obteve-se uma taxa de sobrevivência *ex vitro* das plântulas de GF677 de 47,80% e com o substrato VECO3 (Giffy Preformas®) de apenas 12,5%. Contudo, é de salientar que no substrato VECO3 foram apenas colocadas plântulas sem raiz, o que pode ter contribuído em parte para a tão baixa taxa de sobrevivência *ex vitro* das plântulas de GF677 neste caso. Assim sendo, não foi possível concluir se o substrato utilizado afetou ou não significativamente a taxa de sobrevivência *ex vitro* das plântulas e consequentemente, a fase de aclimatização *ex vitro* de GF677. Ainda assim, o substrato que pareceu mais adequado à fase de aclimatização *ex vitro* de GF677 foi a mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1 (v/v). Futuramente, dever-se-iam testar outros substratos e outras

proporções de turfa e perlite, para além de outras condições ambientais como a temperatura e humidade da estufa de aclimatização, de forma a obter uma taxa de sobrevivência *ex vitro* de GF677 próxima de 100%.

Do trabalho efetuado durante este estágio resultaram 9429 plântulas de GF677, que se encontram em várias fases do processo de propagação *in vitro*.

3.2. Propagação *in vitro* do porta-enxertos Vlach

3.2.1. Indução da formação de rebentos epicórmicos

Devido à escassez de material juvenil de Vlach e de forma a aumentar o número de explantes disponíveis para iniciar a propagação *in vitro*, foram recolhidos alguns ramos adultos da planta-mãe (clone 0), com o objetivo de induzir a formação de rebentos epicórmicos. Este material vegetal, após um pré-tratamento com o antifúngico Switch®, foi sujeito a um tratamento pelo frio durante 90 a 99 dias. Após esse período de tempo, uma parte do material vegetal foi pulverizada com BAP uma vez por semana durante seis semanas e a outra parte não (controlo) (Anexo 2). O objetivo destes 2 testes com e sem a aplicação de BAP foi determinar o efeito desta citocinina na formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos de Vlach (Figuras 33 e 34).



Fig.33 - Rebentos epicórmicos formados nos ramos adultos de Vlach no teste com a aplicação de BAP na concentração de 2 mg/l, após quatro semanas de indução.



Fig.34 - Rebentos epicórmicos formados nos ramos adultos de Vlach no teste sem a aplicação de BAP, após quatro semanas de indução.

Ambos os métodos de indução da formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos de Vlach (com e sem a aplicação de BAP) revelaram-se adequados para o clone 0 de Vlach, pois verificou-se o início da formação de rebentos epicórmicos apenas após nove dias da sua indução. Contudo, os rebentos formados começaram a secar e a mostrar alguma contaminação nas folhas após quatro semanas de indução. Adicionalmente, não se verificaram diferenças significativas quanto ao número, comprimento e qualidade dos rebentos formados entre os testes com e sem a aplicação de BAP (Figuras 33 e 34). Futuramente, dever-se-iam testar outros pré-tratamentos com concentrações superiores de Switch®, outros antifúngicos ou a combinação de dois ou mais antifúngicos.

Após seis semanas de indução, os rebentos epicórmicos de Vlach (em todos os estados de desenvolvimento) foram sujeitos a um processo químico de desinfecção e de seguida, inoculados em meio de cultura para a indução de rebentação axilar.

3.2.2. Estabelecimento *in vitro*

3.2.2.1. Pré-tratamento das plantas-mãe e desinfecção do material vegetal

As plantas-mãe de Vlach (4 clones: 0, 1, 2 e 3) foram sujeitas a um pré-tratamento com o antifúngico Switch® duas semanas antes da recolha dos explantes para o estabelecimento *in vitro*.

Para o estabelecimento *in vitro* de Vlach procedeu-se à desinfecção do material vegetal recolhido das plantas-mãe (ramos e folhas jovens, gomos axilares e apicais e rebentos epicórmicos). O objetivo destes testes foi otimizar o método de desinfecção de acordo com os diferentes tipos de explantes de Vlach.

O método de desinfecção dos gomos e rebentos epicórmicos de Vlach foi idêntico ao descrito anteriormente para GF677, à exceção de que nestes casos se adicionou ao material vegetal lixívia comercial a 40% durante 20 minutos. O aumento na percentagem de lixívia teve que ver com o maior grau de contaminação dos explantes do género *Juglans* (Claudot *et al.*, 1992; Ripetti *et al.*, 1994; Chenevard *et al.*, 1995; Saadat e Hennerty, 2001; Leal *et al.*, 2007; Peixe *et al.*, 2016). Adicionalmente, no caso dos gomos, estes foram colocados numa placa de micropoços com o antibiótico Ampicilina-Sódio na concentração de 50 mg/l durante 30 minutos, de forma a eliminar possíveis contaminações bacterianas comuns nos explantes do género *Juglans*.

O método de desinfecção dos gomos de Vlach revelou-se inadequado, pois conduziu a uma taxa de contaminação de 100% e a uma baixa taxa de sobrevivência dos explantes *in vitro*, que começaram a oxidar e consequentemente a secar após poucas

semanas de cultura. Apesar do tratamento dos explantes com o antibiótico Ampicilina-Sódio na concentração de 50 mg/l durante 30 minutos, foi obtida uma taxa de contaminação bacteriana dos gomos de 100%. Perante estes resultados, dever-se-ia testar um maior período de contacto dos explantes com o antibiótico, a utilização de uma maior concentração do antibiótico, o uso de um outro antibiótico mais específico e/ou a sua incorporação no próprio meio de cultura. De forma a reduzir a oxidação dos explantes *in vitro*, após o processo de desinfeção destes, poderia ser efetuada a sua passagem numa solução antioxidante antes da inoculação em meio de cultura e/ou optar por incluir um agente antioxidante também no meio de cultura (ácido ascórbico, etc).

Após seis semanas de cultura, o único rebento obtido de um gomo axilar apresentava uma contaminação bacteriana endógena. De modo a eliminar essa contaminação foi utilizado o antibiótico Ampicilina-Sódio na concentração de 50 mg/l mas com o dobro do período de contacto (1 hora). Novamente, verificou-se a presença da contaminação bacteriana. Após nove semanas de cultura, os restantes gomos axilares e apicais, sem qualquer rebento desenvolvido e parcialmente oxidados foram também tentados descontaminar. Neste caso, optou-se por multiplicar 10 vezes a concentração de Ampicilina-Sódio utilizada para 500 mg/l. Como se aumentou drasticamente a concentração do antibiótico, diminuiu-se novamente para metade o período de contacto com os explantes, ou seja, 30 minutos. Mais uma vez, foi obtida uma taxa de contaminação bacteriana dos gomos de 100%. Estes resultados demonstraram a ineficácia do uso do antibiótico Ampicilina-Sódio na desinfeção dos gomos de Vlach nas concentrações e tempos de contacto testados. Desta forma, deveria ser testado um antibiótico mais específico para a desinfeção dos gomos de Vlach. Para isso, seria necessário identificar a estirpe bacteriana presente utilizando técnicas microbiológicas e moleculares.

O método de desinfeção dos rebentos epicórmicos de Vlach foi igualmente inadequado, pois resultou numa taxa de contaminação de 100% e numa baixa taxa de sobrevivência dos explantes *in vitro*, que começaram a oxidar e consequentemente a secar após poucas semanas de cultura.

O método de desinfeção das folhas de Vlach, utilizadas no teste de organogénese indireta, foi igualmente semelhante ao descrito para GF677, à exceção de que neste caso se adicionou ao material vegetal lixívia comercial a 20% durante 20 minutos. A diminuição na percentagem de lixívia teve que ver com a maior sensibilidade das folhas. O método de desinfeção das folhas de Vlach revelou-se também inadequado, pois apesar de ter resultado numa baixa taxa de contaminação (5,50%) conduziu a

uma reduzida taxa de sobrevivência dos explantes *in vitro*, que começaram a oxidar e consequentemente a secar após poucas semanas de cultura.

Finalmente, o método de desinfecção dos ramos jovens de Vlach foi exatamente igual ao descrito para GF677, à exceção de que neste caso apenas se testou o tempo de contacto dos explantes com a lixívia de 20 minutos, devido à limitada quantidade de material disponível para a realização de ensaios. O método de desinfecção dos ramos jovens de Vlach foi adequado, pois conduziu a uma baixa taxa de contaminação (31,32%) e uma elevada taxa de sobrevivência médias dos explantes *in vitro*.

3.2.2.2. Indução da rebentação axilar

Para a indução da rebentação axilar da cultura de Vlach foram utilizados como explantes gomos axilares e apicais (Figura 35), rebentos epicórmicos (Figura 37) e segmentos nodais e apicais com 2 a 3 cm de comprimento (Figura 38). Na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach, no caso dos gomos axilares e apicais foi testado apenas 1 meio de cultura (meio M1). No caso dos rebentos epicórmicos (todos os estados de desenvolvimento) foram testados 2 meios de cultura (meios M2 e M3). Finalmente, no caso dos segmentos nodais e apicais foram testados 3 meios de cultura (meios M4, M5 e M6). No total, na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach foram testados 6 meios de cultura (ver Quadro 7, página 64). O objetivo destes 6 testes com diferentes formulações minerais (MS, ½ MS, DKW e WPM), concentrações de BAP (0 mg/l, 0,5 mg/l e 1 mg/l) e concentrações do agente gelificante (0 g/l e 7 g/l) foi otimizar a composição do meio de cultura a utilizar na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach, de acordo com o tipo de explante.

Relativamente à formulação mineral do meio de cultura, vários meios foram utilizados na propagação *in vitro* de *J. regia* tais como o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), WPM (Woody Plant Medium, Lloyd e McCown, 1981) e DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) (Paygahzadeh e Kazemitabar, 2011; Yari *et al.*, 2014a). Desde 1984, que o meio DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) é frequentemente utilizado para a propagação *in vitro* de *J. regia*. Este meio foi inicialmente desenvolvido para os híbridos Paradox mas, de um modo geral, conduz a uma boa resposta na maioria das *Juglandaceas* (Driver e Kuniyuki, 1984; Heile-Sudholt *et al.*, 1986; McGranahan e Leslie, 1988; Leslie e McGranahan, 1992; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Carlos, 2014).

Segundo Saadat e Hennerty (2002) e Yari *et al.* (2014a), o meio DKW é o mais apropriado pois estas espécies necessitam de um elevado nível de azoto durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro*. O meio DKW apresenta uma elevada

concentração iónica de azoto semelhante à do meio MS, mas também altas concentrações de outros iões ausentes na formulação MS (Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011). Contrariamente, o meio WPM frequentemente utilizado na propagação *in vitro* de espécies lenhosas, não é adequado para *J. regia* pois apresenta uma baixa concentração iónica (Driver e Kuniyuki, 1984; Saadat e Hennerty, 2002; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Yari *et al.*, 2014a).

Adicionalmente, a utilização de BAP na concentração de 1 mg/l, normalmente suplementada com IBA na concentração de 0,01 mg/l, apresenta uma aplicação mais ou menos generalizada nas fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos e variedades de *J. regia* (Driver e Kuniyuki, 1984; Gruselle *et al.*, 1987; McGranahan e Leslie, 1988; Penuela *et al.*, 1988; Revilla *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 1989; Saadat e Hennerty, 2002; Leal *et al.*, 2007; Carlos, 2014).

Neste sentido, testou-se o meio de cultura M1, composto pelo meio DKW suplementado com BAP na concentração de 1 mg/l e IBA na concentração de 0,01 mg/l, na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach (Figura 35).



Fig.35 - Estabelecimento *in vitro* de gomo axilar de Vlach no meio de cultura M1.

O meio de cultura M1 demonstrou ser inadequado à fase de estabelecimento *in vitro* dos gomos axilares e apicais de Vlach, uma vez que apenas se formou um único rebento axilar (2,2%) obtido de um gomo axilar, após cinco semanas de cultura (Figura 36). Os restantes gomos axilares e apicais (97,8%) não desenvolveram qualquer rebento e começaram a oxidar e consequentemente a secar após poucas semanas de cultura.

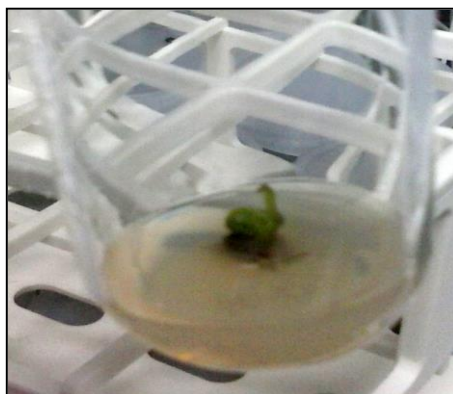


Fig.36 - Rebroto obtido de gomo axilar de Vlach no meio de cultura M1, após cinco semanas de cultura.



Fig.37 - Estabelecimento *in vitro* de rebento epicórmico de Vlach no meio de cultura M2.

Os meios de cultura de baixa concentração iónica M2 (meio MS) e M3 (meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$) demonstraram também ser inadequados à fase de estabelecimento *in vitro* dos rebentos epicórmicos de Vlach, uma vez que não houve qualquer formação de novos rebentos axilares durante esta fase.

Devido às elevadas taxas de contaminação e baixa resposta dos explantes de Vlach *in vitro*, optou-se por testar 2 novos meios de cultura de baixa concentração iónica, compostos pelo meio WPM e suplementados com BAP na concentração de 0,5 mg/l e o produto PTC³® (PhytoTechnology laboratories®) na concentração de 1 ml/l (M4 e M5) (Figura 38). O produto PTC³® (do inglês *plant tissue culture contamination control*) é um produto comercial utilizado para o controlo de contaminações microbianas e fúngicas (largo espectro) em cultura *in vitro*. Para além disso, o meio de cultura M4 apresentava uma concentração do agente gelificante, neste caso agar de 7 g/l (meio sólido), enquanto que o meio M5 apresentava uma concentração de agar de 0 g/l (meio líquido). Para além destes 2 meios de cultura, optou-se por testar um terceiro meio de cultura utilizado com sucesso na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677 e composto pelo meio MS com redução da concentração de mio-inositol para 10 mg/l e suplementado com BAP na concentração de 0,5 mg/l (meio de estabelecimento M6) e o produto PTC³® na concentração de 1 ml/l. O objetivo destes 3 testes com diferentes formulações minerais (MS e WPM) e concentrações de agar (0 g/l e 7 g/l) foi otimizar a

composição do meio de cultura a utilizar na fase de estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais e apicais de Vlach (Gráfico 12).



Fig.38 - Estabelecimento *in vitro* de segmento nodal de Vlach no meio de cultura M5.

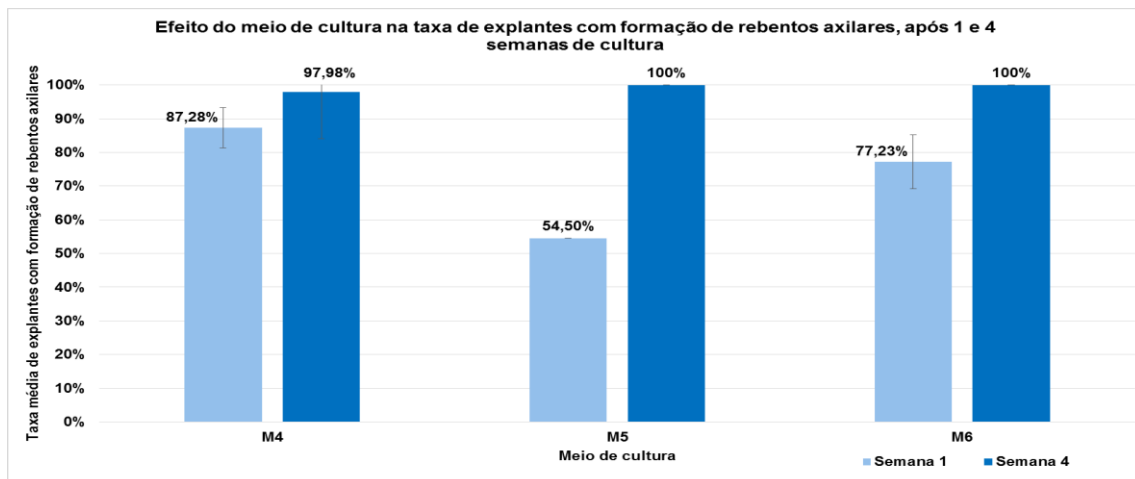


Gráfico 12 - Avaliação do efeito dos meios de cultura M4, M5 e M6 na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach, após uma e quatro semanas de cultura.

Como se pode verificar através da análise do gráfico 12, os três meios de cultura testados demonstraram ser adequados à fase de estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais e apicais de Vlach, pois conduziram a elevadas taxas médias de explantes com formação de rebentos axilares e bons comprimentos médios destes, após uma e quatro semanas de cultura (Figura 39). Nos três meios testados, a formação dos primeiros rebentos axilares verificou-se logo após uma semana de cultura, em todos os clones. Para além disso, pareceram existir diferenças estatisticamente significativas relativamente às taxas médias de explantes com formação de rebentos axilares entre os meios testados, após uma semana de cultura. Após uma semana de cultura, a taxa média de explantes com formação de rebentos axilares no meio M4 era de 87,28%, no meio M5 era de 54,50% e no meio de cultura M6 era de 77,23%. Contudo, após quatro semanas de cultura, as taxas médias de explantes com formação de rebentos axilares nos três meios de cultura testados eram

bastante similares, nomeadamente, de 97,98% no meio M4 e de 100% nos meios M5 e M6. Também não se verificaram diferenças significativas relativamente ao comprimento médio dos rebentos entre os três meios de cultura, em todos os clones, após uma e quatro semanas de cultura.

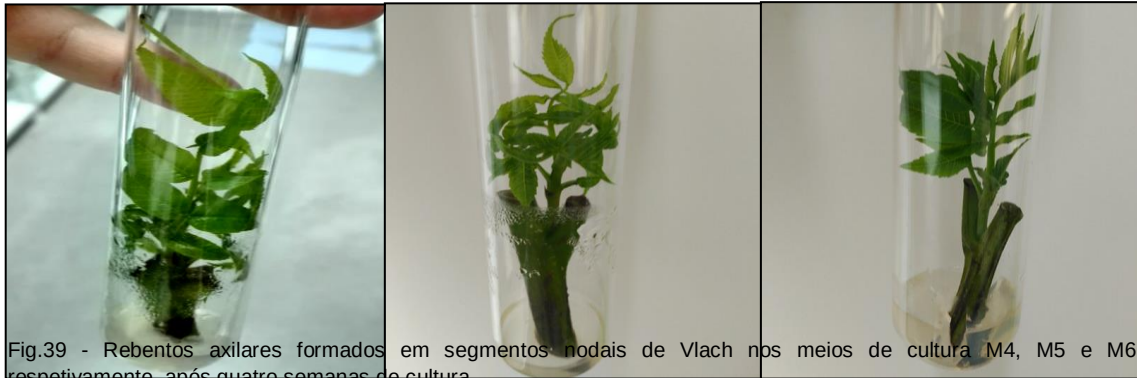


Fig.39 - Rebentos axilares formados em segmentos nodais de Vlach nos meios de cultura M4, M5 e M6, respetivamente, após quatro semanas de cultura.

Uma das razões que pode explicar a menor taxa média de explantes com formação de rebentos axilares após uma semana de cultura no meio M5, pode ter que ver com o maior comprimento dos explantes inoculados neste meio. Como o meio M5 era líquido foi necessário inocular explantes maiores, de modo a evitar a emersão dos gomos axilares e apicais. O maior comprimento dos explantes (3 a 4 cm) significa um maior número de células e consequentemente, um maior tempo de transporte dos nutrientes do meio de cultura até aos pontos meristemáticos em divisão ativa, o que poderá ter atrasado a formação dos rebentos axilares neste meio de cultura.

Perante os resultados obtidos, a concentração do agente gelificante no meio de cultura WPM não pareceu afetar significativamente a taxa de explantes com formação de rebentos axilares e consequentemente, a fase de estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais e apicais de Vlach. Para além disso, contrariamente ao verificado por vários autores em *J. regia* (Driver e Kuniyuki, 1984; Saadat e Hennerty, 2002; Payghamzadeh e Kazemitabar, 2011; Yari *et al.*, 2014a), o meio de cultura WPM demonstrou ser bastante eficaz na indução da formação de rebentos axilares na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach. Estes resultados sugerem que a redução da concentração iónica do meio de cultura WPM promove a formação de rebentos axilares em Vlach, contrariamente aos meios de cultura DKW, MS e $\frac{1}{2}$ MS testados anteriormente. Já os meios de cultura WPM e MS com redução da concentração de mio-inositol para 10 mg/l demonstraram serem adequados à fase de estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais e apicais de Vlach.

Concluindo, o meio de cultura mais adequado (mais eficaz e económico) à fase de estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais e apicais de Vlach foi o meio de cultura

M5, composto pelo meio WPM suplementado com BAP na concentração de 0,5 mg/l e o produto PTC³ na concentração de 1 ml/l, e sem um agente gelificante (meio líquido).

3.2.2.3. Indução da organogénese indireta

Para a indução da organogénese indireta da cultura de Vlach foram utilizados como explantes fragmentos foliares com aproximadamente 1 cm² contendo a nervura principal, obtidos de plantas *ex vitro* (Figura 40). Os explantes foram inoculados com a página adaxial em contacto com o meio de cultura D2C0,5IA, composto pelo meio DKW suplementado com CPPU na concentração de 2 mg/l e IAA na concentração de 0,5 mg/l. Este meio de cultura é uma adaptação da formulação M2C0,5IA para o género *Juglans*. O objetivo deste teste foi determinar se o meio de cultura D2C0,5IA promovia a organogénese indireta a partir de folha em Vlach.



Fig.40 - Estabelecimento *in vitro* de fragmento foliar de Vlach no meio de cultura D2C0,5I.

Foi realizado apenas 1 ensaio com o meio de cultura D2C0,5IA. Este meio de cultura demonstrou ser inadequado à organogénese indireta a partir de folha em Vlach, pois não induziu qualquer formação de *calli* (calogénese) (Figura 41).



Fig.41 - Fragmento foliar de Vlach no meio de cultura D2C0,5IA, após quatro semanas de cultura.

Apesar deste resultado, não foram efetuados novos testes de organogénese indireta com outros meios de cultura, pois não havia material vegetal jovem de Vlach

suficiente. Para além disso, foram entretanto obtidos bons resultados de propagação *in vitro* de Vlach pela via direta (rebentação axilar).

3.2.3. Multiplicação *in vitro*

Após quatro semanas de cultura, os rebentos de Vlach obtidos na fase anterior foram transferidos para meio de multiplicação. Na fase de multiplicação *in vitro* de Vlach foi testado apenas 1 meio de cultura, utilizado com sucesso na fase de estabelecimento *in vitro* (meio de estabelecimento M4). Após quatro semanas, foi feita a subcultura dos rebentos de Vlach para meio de cultura novo. No total foi feita apenas 1 repicagem dos rebentos de Vlach para meio de multiplicação. Nesta repicagem foi avaliada a taxa de contaminação, sobrevivência e multiplicação de cada clone. O objetivo deste teste foi determinar se este meio de cultura era ou não adequado à fase de multiplicação *in vitro* de Vlach.

Após quatro semanas da primeira repicagem dos rebentos de Vlach para meio de multiplicação foi obtida uma taxa de contaminação de todos os clones de 100%, pelo que não se efetuou a segunda repicagem dos rebentos. Deste modo, não foi possível determinar a taxa de multiplicação dos rebentos e consequentemente, concluir acerca do sucesso deste meio de cultura na fase de multiplicação *in vitro* de Vlach. Assim sendo, futuramente dever-se-iam realizar outros ensaios para a otimização da composição do meio de cultura a utilizar nesta fase.

As elevadas contaminações microbianas endógenas dos explantes de Vlach não permitiram a otimização das restantes fases do processo de propagação *in vitro*. As possíveis soluções para este problema são a utilização de outras plantas-mãe, o uso de diferentes métodos de desinfeção do material vegetal e o isolamento e identificação da estirpe bacteriana responsável pela contaminação recorrente, de forma a utilizar um antibiótico mais específico e portanto, mais eficaz.

Capítulo 4 - Outras atividades

Durante o estágio final de mestrado na Deifil, foram desenvolvidas complementarmente aos objetivos definidos diversas tarefas inerentes à propagação *in vitro* de inúmeras outras culturas. Essas tarefas englobaram as fases de estabelecimento *in vitro*, multiplicação e alongamento *in vitro*, enraizamento *in vitro/ex vitro* e aclimatização *ex vitro*.

Mais concretamente, para além dos porta-enxertos GF677 e Vlach, foi realizada a propagação *in vitro* de inúmeras variedades e porta-enxertos de plantas fruteiras como o medronheiro, a oliveira, o mirtilo, o kiwi, a macieira, o pistácio e os citrinos, bem como de plantas ornamentais como a orquídea, a roseira e o azevinho. Adicionalmente, foram otimizados protocolos de germinação *in vitro*, nomeadamente de sementes do porta-enxertos UCB-1 de pistácio. Foram ainda realizadas inúmeras tarefas complementares ao processo de micropropagação tais como a preparação e distribuição dos meios de cultura e a desinfecção do material laboratorial.

No total, ao longo do estágio foram produzidas cerca de 32370 plântulas de outras culturas (Multiplicação: 29758 e Enraizamento: 2612). Para além disso, foi realizada a aclimatização *ex vitro* de uma quantidade também considerável de plantas.

Para concluir, este estágio na Deifil permitiu-me a aquisição de conhecimentos no âmbito da biotecnologia vegetal relativamente a uma grande variedade de culturas de interesse agronómico e por outro lado desenvolver importantes competências técnicas e profissionais em contexto real de trabalho.

Capítulo 5 - Conclusão

O principal objetivo deste estágio foi o desenvolvimento e a otimização de protocolos de produção *in vitro* dos porta-enxertos GF677 e Vlach, tendo em consideração a literatura publicada e as condições e recursos existentes na Deifil, com o intuito de serem futuramente utilizados pela empresa para a produção destas plantas à escala industrial e com um custo competitivo no mercado.

De modo a atingir este objetivo foi feita a indução da formação de rebentos epicórmicos, a otimização do pré-tratamento das plantas-mãe, a otimização do método de desinfeção dos explantes, a realização de estabelecimentos em diferentes épocas do ano, a propagação *in vitro* mediante diferentes vias de regeneração clonal como a rebentação axilar e a organogénese indireta e a otimização da composição do meio de cultura ou substrato ao longo das várias fases do processo. Adicionalmente, foi feita a comparação de diferentes clones do porta-enxertos GF677 de modo a detetar diferenças entre os genótipos e desta forma selecionar os melhores clones para a propagação *in vitro* em grande escala.

Neste capítulo serão apresentadas as principais conclusões retiradas dos testes efetuados com o objetivo de otimizar o processo de propagação *in vitro* dos porta-enxertos GF677 e Vlach.

Relativamente ao método de indução da formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos de GF677, este demonstrou ser adequado exclusivamente para o clone IV, uma vez que este foi o único clone onde se verificou o início da formação de rebentos epicórmicos apenas após sete dias da sua indução. O facto de ter verificado a formação de rebentos epicórmicos somente após sete dias, parece indicar que a pulverização dos ramos adultos de GF677 com BAP apresentou um efeito positivo na formação de rebentos epicórmicos.

No caso dos pré-tratamentos fitossanitários das plantas-mãe com o antifúngico Switch® na concentração de 3 g/l, estes não pareceram afetar significativamente a taxa de contaminação dos explantes *in vitro* e consequentemente, a fase de estabelecimento *in vitro* de GF677. Contudo, o teste sem pré-tratamento das plantas-mãe conduziu à taxa de contaminação média dos explantes *in vitro* mais elevada (25,73%).

Relativamente ao método de desinfeção dos explantes de GF677, o método que envolvia um tempo de contacto de 20 minutos dos explantes com a lixívia a 30% demonstrou ser o mais eficaz, pois resultou numa menor taxa média de contaminação dos explantes *in vitro* (21,72%).

Na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677, o meio de cultura testado que se revelou mais adequado à indução de rebentação axilar foi o meio de cultura M1, composto pelo meio MS com redução da concentração de mio-inositol para 10 mg/l e suplementado com BAP na concentração de 0,1 mg/l. Para além disso, o clone de GF677 que apresentou uma melhor resposta nesta fase, isto é, que obteve uma maior taxa média de explantes com formação de rebentos axilares após uma semana de cultura foi o clone V (73,18%). Já o meio de cultura M2C0,5I, testado com sucesso noutras espécies (Deifil, resultados, não publicados), não apresentou sucesso na indução de organogénese indireta a partir de folha na fase de estabelecimento *in vitro* de GF677.

A composição do meio de cultura pareceu também afetar significativamente a taxa de multiplicação dos rebentos e consequentemente, a fase de multiplicação *in vitro* de GF677. O meio de cultura testado que se revelou mais adequado a esta fase foi o meio de cultura M10, composto pelo meio MS com redução da concentração a $\frac{1}{2}$ e suplementado com BAP na concentração de 0,5 mg/l, pois conduziu à taxa de multiplicação média dos rebentos mais elevada (3,05). Para além disso, verificou-se que a redução da concentração de mio-inositol no meio de cultura MS pareceu afetar significativamente e de forma positiva a taxa de multiplicação dos rebentos e consequentemente, a fase de multiplicação *in vitro* de GF677. Já a redução da concentração do agente gelificante no meio de cultura pareceu afetar significativamente, contudo, de forma negativa a taxa de multiplicação dos rebentos.

Para além do meio de cultura, o genótipo da planta também pareceu influenciar claramente a taxa de multiplicação dos rebentos e por consequência, a fase de multiplicação *in vitro* de GF677. O clone que revelou ter o melhor genótipo, isto é, que apresentou as maiores taxas de multiplicação médias dos rebentos nos meios de cultura testados foi o clone II. Seria importante determinar se estes resultados se repetem ao nível das taxas de enraizamento e de aclimatização e caso este cenário se verifique, poder-se-á optar por micropropagar exclusivamente este clone.

Na fase de enraizamento *in vitro* de GF677, o meio de cultura pareceu afetar significativamente a taxa de enraizamento dos explantes, o número de raízes por plântula, o seu comprimento médio e diâmetro. O meio de cultura testado que se revelou mais adequado a esta fase foi o meio de cultura M8, composto pelo meio MS com redução da concentração dos macronutrientes nitrato de potássio (KNO_3) e nitrato de amónia (NH_4NO_3) para $\frac{1}{2}$ e suplementado com IBA na concentração de 1 mg/l, pois conduziu à taxa de enraizamento dos explantes mais elevada (44,21%), a um elevado número de raízes por plântula, a raízes de elevado diâmetro e com um pequeno comprimento médio, o que facilita a posterior aclimatização *ex vitro* destas plântulas.

Apesar disso, o meio de cultura a utilizar nesta fase deverá continuar a ser otimizado, de forma a obter uma taxa de enraizamento de GF677 próxima de 100%.

Na fase de aclimatização *ex vitro* de GF677, foi possível verificar que a presença/ausência de raiz nas plântulas pareceu afetar consideravelmente a sua taxa de sobrevivência *ex vitro*, uma vez que a taxa de sobrevivência *ex vitro* das plântulas com raiz (66,70%) foi o dobro da taxa de sobrevivência *ex vitro* das plântulas sem raiz (33,20%).

Finalmente, não foi possível concluir se o substrato utilizado afetou ou não significativamente a taxa de sobrevivência *ex vitro* das plântulas e consequentemente, a fase de aclimatização *ex vitro* de GF677. Contudo, o substrato que pareceu ser mais indicado a esta fase foi a mistura de turfa e perlite na proporção de 1:1 (v/v) (taxa de sobrevivência *ex vitro* de 47,80%). Futuramente, dever-se-iam testar outros substratos e outras condições ambientais como a temperatura e humidade da estufa de aclimatização, de forma a obter uma taxa de sobrevivência *ex vitro* de GF677 próxima de 100%.

No caso do porta-enxertos Vlach, ambos os métodos de indução da formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos testados revelaram-se adequados para o clone 0, pois verificou-se o início da formação de rebentos epicórmicos somente após nove dias da sua indução. Para além disso, a aplicação de BAP não pareceu afetar significativamente a formação dos rebentos epicórmicos.

O método de desinfecção dos explantes de Vlach foi adaptado de acordo com os diferentes tipos de explantes utilizados. Os métodos de desinfecção dos gomos e dos rebentos epicórmicos de Vlach demonstraram ser inadequados, pois resultaram em elevadas taxas de contaminação (100%) e em baixas taxas de sobrevivência dos explantes *in vitro*, que começaram a oxidar e consequentemente a secar após poucas semanas de cultura. Também o método de desinfecção das folhas de Vlach se revelou inapropriado, pois apesar de ter resultado numa baixa taxa de contaminação (5,50%) conduziu a uma reduzida taxa de sobrevivência dos explantes *in vitro*, que de forma semelhante aos gomos e rebentos epicórmicos começaram a oxidar e consequentemente a secar após poucas semanas de cultura. Finalmente, o método de desinfecção dos ramos jovens de Vlach revelou ser adequado, pois conduziu a uma baixa taxa de contaminação (31,32%) e a uma elevada taxa de sobrevivência médias dos explantes *in vitro*.

Na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach, o meio de cultura testado que se revelou mais adequado à indução de rebentação axilar foi o meio de cultura M5, composto pelo meio WPM suplementado com BAP na concentração de 0,5 mg/l e o produto PTC³ na concentração de 1 ml/l (meio líquido). Já o meio de cultura D2C0,5I não

apresentou qualquer sucesso na indução de organogénese indireta a partir de folha na fase de estabelecimento *in vitro* de Vlach.

Finalmente, as elevadas contaminações microbianas endógenas dos explantes de Vlach constituíram o principal fator limitante da sua propagação *in vitro*, pois não permitiram a otimização das restantes fases do processo.

Em jeito de conclusão, o objetivo definido para GF677 foi alcançado, isto é, foram otimizadas todas as fases do processo de propagação *in vitro*. No caso de Vlach, apenas se otimizou o processo de propagação *in vitro* até à fase de estabelecimento. Contudo, o tempo previsto do estágio (9 meses) não permitiu a realização de mais testes, nem de mais réplicas de cada teste. Todavia, cada amostra apresentava sempre um $n \geq 100$ explantes.

Futuramente, os protocolos de produção *in vitro* destes porta-exertos desenvolvidos durante este estágio deverão continuar a ser otimizados de modo a serem futuramente utilizados pela empresa para a produção destas plantas à escala industrial e com um custo competitivo no mercado. Do trabalho efetuado durante este estágio, resultaram 9429 plântulas de GF677 e 32370 plântulas de outras culturas, o que completou um total de 41799 plântulas.

Para finalizar, este estágio permitiu-me também adquirir novos conhecimentos teóricos e práticos na área da biotecnologia vegetal, bem como desenvolver importantes competências técnicas e profissionais em contexto real de trabalho.

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

Aghaye RNM, Yadollahi A (2012) Micropropagation of GF677 rootstock. *Journal of Agricultural Science* **4**:131-138

Ahmad T, Rahman HU, Ahmad CH, Laghari MH (2003) Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF677. *Pakistan Journal of Botany* **35**:331–338

Ahmad T, Ur-Rahman H, Laghari MH (2004) Effect of different auxin on *in vitro* rooting of peach rootstock GF677. *Sarhad Journal of Agriculture* **20**:373-375

Alanagh EN, Garoosi GA, Haddad R (2010) The effect of PGRs on *in vitro* shoot multiplication of GF677 hybrid (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) rootstock on GNH medium. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding* **1**:34-43

Altman A (2000) Micropropagation of plants, principles and practice. In RE Spier, eds, *Encyclopedia of Cell Technology*. John Wiley and Sons, New York, pp 916-929

Amaral JS, Seabra RM, Andrade PB, Valentão P, Pereira JA, Ferreres F (2004) Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chemistry* **88**:373

Antonopoulou C, Dimassi TK, Therios I, Chatzissavvidis C (2004) The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentration of peach rootstock GF677. *Biologia Plantarum* **48**:549–553

Augé R, Beauchesne G, Gibod-Boccon J, Decourtye L, Digat B, Jalouzot R, Minier R, Monrand J, Reynoird J, Strullu D, Vidalie H (1989) La culture *in vitro* et ses applications horticoles. JB Baillière, Beauvais, pp 57-62

Beer R, Kaiser F, Schmidt K, Ammann B, Carraro G, Grisad E, Tinner W (2008) Vegetation history of the walnut forests in Kyrgyzstan (Central Asia): natural or anthropogenic origin?. *Quaternary Science Reviews* **27**:621–632

Bellamine J, Penel C, Greppin H, Gaspar T (1998) Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phase of adventitious root formation. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 191-194

Bento AA (2017). Seminário “Amendoeira: Produção e Valorização”. 16 de junho, Valpaços

- Bourrain L** (2009) *In vitro* walnut micropropagation. *Juglans regia* L. application. Walnut propagation training short course, Murcia, Spain, pp 15-16
- Brito G, Jardim R, Santo C, Coelho C** (2007) Micropropagação de uma espécie Autóctone de Porto Santo como estratégia de combate à desertificação: Exemplo da Oliveira-Brava. *Silva Lusitana* **15**:231-232
- Caboni E, Tonelli MG, Lauri P, Iacovacci P, Kevers C, Damiano C, Gaspar T** (1997) Biochemical aspects of almond microcuttings related to *in vitro* rooting ability. *Biologia Plantarum* **39**:91-97
- Carlos RMNV** (2014) Multiplicação *in vitro* de cultivares e porta-enxertos de nogueira (*Juglans regia* L.); Estudo das fases de enraizamento e climatização. Master's thesis. University of Evora, Evora
- Castellano MM, Sablowski R** (2005) Intercellular signaling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems. *Current Opinion in Plant Biology* **8**:26–31
- Channuntapipat C, Sedgley M, Collins G** (2003) Micropropagation of almond cultivars *Nonpareil* and *Ne Plus Ultra* and the hybrid rootstock *Titan* × *Nemaguard*. *Scientia horticulturae* **98**:473-484
- Charrera M, Parasi GA, Monet R** (1998) Rootstock influence on the performance of the peach variety "Catherine". *Acta Horticulturae* **465**:573-577
- Chenevard D, Jay-Allemand C, Gendraud M, Frossard JS** (1995) The effect of sucrose on the development of hybrid walnut microcuttings (*Juglans nigra* × *Juglans regia*). Consequences on their survival during acclimatization. *Annales des Sciences Forestières* **52**:147-156
- Clark JR, Hemery GE, Savill PS** (2008) Early growth and form of common walnut (*Juglans regia* L.) in mixture with tree and shrub nurse species in southern England. *Forestry* **81**:631
- Claudot AC, Drouet A, Jay-Allemand CH** (1992) Tissue distribution of phenolic compounds in annual shoots from adult and rejuvenated hybrid walnut trees. *Plant Physiology and Biochemistry* **30**:565–572
- Conger BV** (1981) Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press Inc, Boca Raton, pp 11-22

Cossio F, Minotta G (1983) Prove preliminary di coltura *in vitro* di embrioni isolati di noce (*Juglans regia* L.) e confronto tra differenti combinazioni di sali minerali. Riv Ortoflorofrutt It **67**:287–298

Couto M (2003) Propagação *in vitro* dos porta-enxertos híbridos de pessegueiro ‘Barrier’ e ‘Cadaman’ (*Prunus* sp.). Master’s thesis. Federal University of Pelotas, Eliseu Maciel Agronomy college, Pelotas

De Klerk GJ, Van der Krieken W, De Jong JC (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **35**:189–199

De Rigo D, Enescu CM, Houston Durrant T, Tinner W, Caudullo G (2016) *Juglans regia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In San-Miguel-Ayán J, De Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A, eds, European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp 1977

Debergh PC (2000) Micropropagation, Hyperhydricity. In RE Spier, eds, Encyclopedia of Cell Technology, Ed 1, Vol 1. John Wiley and Sons, New York, pp 929-933

DeBuse C, Buchner R, Lampinen B, McGranahan G, Leslie C, Ramos D, Metcalf S, Hackett W, Gilles C, Spanfelner F (2010) 2010 Walnut clonal Paradox rootstock trials in northern California, http://walnutresearch.ucdavis.edu/2010/2010_59.pdf. Página visualizada em 2016

DeBuse C, Buchner R, Lampinen B, McGranahan G, Leslie C, Ramos D, Metcalf S, Hackett W, Gilles C, Spanfelner F (2011) 2011 Walnut clonal Paradox rootstock trials in northern California. Walnut Research Reports 2011, http://walnutresearch.ucdavis.edu/2011/2011_93.pdf. Página visualizada em 2016

Dimassi TK, Economou AS (1995) Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF677 (*Prunus persica* x *P. amygdalus*). Plant Cell Reports **15**:87–90

Dodds JH, Roberts LW (1986) Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, eds, Ed 2. New York, pp 232

Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Gruselle R, Meier-Dinkel A, Jay-Allemand C, Gaspar T (2004) Practical factors controlling *in vitro* adventitious root formation from walnut shoot microcuttings. Journal of the American Society for Horticultural Science **129**:198–203

Driver JA, Kuniyuki AH (1984) *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. Horticultural Science **19**:507–509

Duke JA (1983) *Juglans regia* L. In JA Duke, Handbook of Energy Crops, unpublished. https://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Juglans_regia.html. Página visualizada em 2016

El Ghardi A, Jraidi B (1994) Performance of rootstocks of almond, peach and peach × almond hybrids with regard to iron chlorosis. Acta Horticulturae **373**:91-97

Ercisli S, Sayinci B, Kara M, Yildiz C, Ozturk I (2012) Determination of size and shape features of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using image processing. Scientia Horticulturae **133**:47

Fasolo F, Malavasi F, Ranieri R (1987) Preliminary investigation on *in vivo* rooting of micropropagation of GF677, peach rootstock. Acta Horticulturae **212**:181-287

Fatima A, Kamili AN, Shah AM (2006) Plantlet regeneration from excised embryonal axes, shoot apices, and nodal segments of *Juglans regia* L. Acta Horticulturae **705**:387–392

Ferreira J, Strecht A, Serrador F, Torres L, Marques JC, Silva M, Cunha-Queda AC, Rodrigues JR, Franco JC, Mourão I, Brito M, Marreiros A, Fernandes MM, Valente F, Vasconcelos E, Cabral F, Marques G (2012). Proteção fitossanitária. Pragas e doenças das árvores de fruto – meios de proteção. Pragas e doenças dos frutos secos. In J Ferreira, A Strecht, F Serrador, L Torres, JC Marques, M Silva, AC Cunha-Queda, JR Rodrigues, JC Franco, I Mourão, M Brito, A Marreiros, MM Fernandes, F Valente, E Vasconcelos, F Cabral, G Marques, eds, As bases da Agricultura Biológica. Tomo I – Produção vegetal, Ed 2, Vol 1. Edibio, Castelo de Paiva, pp 489

Fiorino P, Loreti F (1987) Propagation of fruit trees by tissue culture in Italy. HortScience **22**:353–358

Fornari B, Cannata F, Spadad M, Malvolti ME (1999) Allozyme analysis of genetic diversity and differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations. Forest Genetics **6**:115

Fotopoulos S, Sotiropoulos TE (2005) *In vitro* rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium exposure to darkness for a period. Agricultural Research **3**:3-8.

Gabinete de Planeamento e Políticas (GPP) (2007a) Amêndoa. Diagnósticos Sectoriais. <http://www.gpp.pt/pbl/Diagnosticos/SubFileiras/Amendoea.pdf>. Página visualizada em 2016

Gabinete de Planeamento e Políticas (GPP) (2007b) Noz. Diagnósticos Sectoriais. <http://www.gpp.pt/pbl/Diagnosticos/SubFileiras/Noz.pdf>. Página visualizada em 2016

Gamborg OL, Miller RA, Ojima O (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Experimental Cell Research* **50**:151-158

Genome Database for Rosaceae (2016) *Prunus* all species. Overview, <https://www.rosaceae.org/species/prunus/all>. Página visualizada em 2016

George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology, Ed 2, Vol 1. Exegetics Ltd, Edington, Wiltshire, pp 61-87

George EF (1996) Plant Propagation by Tissue Culture: In Practice, Ed 1, Vol 1. Exegetics Ltd, Wiltshire

George EF, Sherrington DP (1984) Plant propagation by tissue culture, Ed 1, Vol 1. Exegetics Ltd, Edington, Wiltshire, pp 184-240

Gomes F, Canhoto JM (2009) Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **45**:72–82

Grasselly CH, Duval H (1997) L` Amandier. In Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Paris

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

Gruselle R, Boxus P (1990) Walnut micropropagation. *Acta Horticulturae* **284**:45–52

Hartmann HT, Kester DE, Davies FT Jr, Geneve RL (2010) Hartmann and Kester's plant propagation: principles and practices, Ed 8, Vol 1. Prentice-Hall, New York, pp 644-699

Hasey J, Leslie C, Hackett W, McGranahan G, McKenry M, Browne G, Kluepfel D (2015) Walnut Trees in the Nursery Trade: Understanding Terminology, How they are Propagated, Availability and Clonal Rootstock Pest Interactions. University of California (UC Davis), <http://ucanr.edu/datastoreFiles/391-536.pdf>. Página visualizada em 2016

Hay A, Tsiantis M (2005) From genes to plants via meristems. *Development* **132**:2679–2684

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

Hemery GE, Clark JR, Aldinger E, Claessens H, Malvolti ME, O'Connor E, Raftoyannis Y, Savill PS, Brus R (2010) Growing scattered broadleaved tree species in Europe in a changing climate: a review of risks and opportunities. Forestry **83**:65

Iannamico L (2009) Portainjertos. In L Iannamico, eds, El cultivo del nogal en climas templado-fríos. I. Material vegetal, Ed 1, Vol 1. Estación experimental agropecuaria Alto Valle, Centro regional Patagonia Norte, Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria, Río Negro, pp 35-42

Iliev I, Gajdošová A, Libiaková G, Jain SM (2010) 1 Plant micropropagation. In MR Davey, P Anthony, eds, Plant Cell Culture: Essential Methods, Ed 1, Vol 1. John Wiley and Sons, Chichester, pp 1-23

Instituto Nacional de Estatística (INE) (2013) Estatísticas Agrícolas 2012. Instituto Nacional de Estatística, Publicações, https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes. Página visualizada em 2016

Instituto Nacional de Estatística (INE) (2016) Estatísticas Agrícolas 2015. Instituto Nacional de Estatística, Publicações, https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes. Página visualizada em 2016

Isikalan C, Adiyaman AF, Namli S, Tikat E, Basaran D (2008) *In vitro* micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L.cv *Nonpareil*). African Journal of Biotechnology **7**:1875-1880

Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica **118**:153-166

Jardim Botânico da UTAD (2016a) *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb, http://jb.utad.pt/especie/prunus_dulcis. Página visualizada em 2016

Jardim Botânico da UTAD (2016b) *Juglans regia* L. http://jb.utad.pt/especie/juglans_regia. Página visualizada em 2016

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**:335–342

Jones RW (1969) Selection of intercompatible almond and root-knot nematode resistant peach rootstocks as parents for production of hybrid rootstock seed. *American Society for Horticultural Science* **94**:89-91

Kaltenrieder P, Procacci G, Vanni  re B, Tinner W (2010) Postglacial vegetation and fire history of the Euganean Hills (Colli Euganei) as recorded by sedimentary pollen and charcoal series from Lago della Costa (northeastern Italy). *The Holocene* **20**:679-695

Kamali K, Majidi E, Zarghami R (2001) Micropropagation of GF-677 rootstocks (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). In BE Ak, eds, XI GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds, Cahiers Options M  diterran  ennes, n   56. CIHEAM, Zaragoza, pp 175-177

Kepenek K, Kola  gasi Z (2016) Micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Physica Polonica* **130**:150-156

Kester DE (1970) Growth *in vitro* of tissue of almond, almond hybrids and some other *prunus*. *Horticultural Science* **5**:349

Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* **14**:214-217

Kumar N, Reddy MP (2011) *In vitro* plant propagation: A review. *Journal of Forest Science* **27**:61-72

Leal DR, S  nchez-Olate M, Avil  s F, Materan ME, Uribe M, Hasb  n R, Rodr  guez R (2007) Micropropagation of *Juglans regia* L. In SM Jain, H H  ggman, eds, *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*, Ed 1, Vol 1. Springer, Dordrecht, pp 381–390

Leslie C, McGranahan G (1992) Micropropagation of persian Walnut (*Juglans regia* L.). In EPS Bajaj, eds, *High Technology and Micropropagation II, Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Ed 1, Vol 18. Springer, New York, pp 136–150

Linsmaier M, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **18**:100-127

- Lloyd G, McCown B** (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society **30**:421-327
- Lopes MJC** (2011) Micropropagação *in vitro* da noqueira (*Juglans regia* L.) por rebentação axilar. Graduation thesis. School of Agriculture, Polytechnic Institute of Castelo Branco, Castelo Branco
- Loreti F, Morini S, Grilli A** (1985) Rooting response of PSB2 and GF677 rootstock cuttings. Acta Horticulturae **173**:261-269
- Maragoni B, Antonelli M, Scudellari D, Liverani A** (1985) The behavior of cv 'Redhaven' on different rootstocks. Acta Horticulturae **173**:389-394
- Marques D, Dias J** (2001) *In vitro* shoot culture on *Juglans regia* L. Acta Horticulturae **544**:251-256
- Martínez ML, Labuckas DO, Lamarque AL, Maestri DM** (2010) Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. Journal of the Science of Food and Agriculture **90**:1959
- McGranahan G, Leslie C** (1988) *In vitro* propagation of mature Persian walnut cultivars. HortScience **23**:220
- McGranhan G** (2007) Micropropagation of Walnut Trees (*Juglans regia* L.) and response to arbuscular mycorrhizal inoculation. Pacific Nut Producer **13**:639-645
- Meynier V** (1984) Contribution de la culture de méristèmes a la micropropagation *in vitro* du noyer. Annales de Recherches Sylvicoles **176**:75–82
- Minguzzi A** (1989) Rootstock effects on peach replanting: A ten years trial. Acta Horticulturae **254**:357-361
- Mohni C, Pelleri F, Hemery GE** (2009) The modern silviculture of *Juglans regia* L.: A literature review. Die Bodenkultur **60**:21
- Monteiro AM, Cordeiro VP, Gomes-Laranjo J** (2003) A amendoeira. In João Azevedo Editor, eds, Património Nacional Transmontano, Mirandela, pp 186
- Monteiro BTMS** (2007) Interação *in vitro* entre *Quercus suber* L. e *Phytophthora cinnamomi* Rands. PhD thesis. University of Aveiro, Aveiro
- Monticelli S, Puppi G, Damiano G** (2000) Effects of *in vivo* mycorrhization on micropropagated fruit trees rootstocks. Applied Soil Ecology **15**:105-111

Muñoz AN (2002) “El almendro: variedades y técnicas de cultivo”. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía

Murai Y, Harada H, Yamashita H (1997) *In vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. 'BakuohJunkyou'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **66**:475-480

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum **15**:437-497

Nag S, Saha K, Choudhuri MA (2001) Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. Journal of Plant Growth Regulation **20**:182-194

Nash SD, Westpfal M (2005) Cardiovascular benefits of nuts. The American Journal of Cardiology **95**:963

Navatel J, Bourrain L (2001) Plant production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication. Acta Horticulturae **544**:465–471

Nezami E, Garoosi GA, Haddad R, Hosseini R (2014) A reliable protocol for adventitious shoot regeneration in GF677 and *Rabi* cultivar, a late flowering almond. Journal of Plant Physiology and Breeding **4**:43-53

Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A (2010) Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **29**:81

Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares (OMAIAA) (2011a) Comercialização da Noz em Portugal. Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares, Publicações, artigos, http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=119. Página visualizada em 2016

Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares (OMAIAA) (2011b) A Produção da Amêndoa em Portugal. Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares, Publicações, artigos, http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=134. Página visualizada em 2016

Papoutsi Z, Kassi E, Chinou I, Halabalaki M, Skaltsounis LA, Moutsatsou P (2008) Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. British Journal of Nutrition **99**:715

Paques M (1991) vitrification and micropropagation: Causes, remedies and prospects. *Acta horticulturae* **289**:283-290

Parque de Serralves (2016a) *Juglans regia* L., <http://Serralves.ubiprism.pt/documentos/especie/1110/download>. Página visualizada em 2016

Parque de Serralves (2016b) *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb 'Ferragnes', <http://Serralves.ubiprism.pt/documentos/especie/1351/download>. Página visualizada em 2016

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

Peixe A, Barroso J, Viriato A, Campos D (2016) A multiplicação *in vitro* da noqueira: O caso do 'Paradox'. Simpósio Nacional de Frutos Secos, Ferreira do Alentejo, https://www.esa.ipb.pt/cncfs/images/doc_simposio_fa_2016/Propagacao_Nogueira_-_Peixe.pdf. Página visualizada em 2016

Penuela R, Garavito C, Sanchez-Tames R, Rodríguez R (1988) Multiple shoot-bud stimulation and rhizogenesis induction of embryogenic and juvenile explants of walnut. *Acta Horticulturae* **227**:457-459

Pereira SCV (2009) Principais pragas e auxiliares associados à Amendoeira no Planalto Mirandês. Master's Thesis. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança

Perez-Tornero O, Lopez JM, Egea J, Burgos L (2000) Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. *Canino*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **75**:283-286

Philips Horticulture LED Solutions (2015), www.philips.com/horti. Página visualizada em 2016

Pierik RLM (1997) *In Vitro Culture of Higher Plants*, Ed 4, Vol 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 348

Preece JE (2010) Acclimatization of plantlets from *in vitro* to the ambient environment. In MC Flickinger, eds, *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation and cell technology*. John Wiley and Sons, New York, pp 1-9

Quisen RC, Angelo PCS (2008) Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental, Ed 1, Vol 1. Embrapa Amazônia Ocidental publishers, pp 9-40

Ramos das Neves MA (1997) Estudo comparativo dos mecanismos de resistência à secura de alguns porta-enxertos do género *Prunus* e sua aplicação ao melhoramento. PhD thesis. University of Algarve, Faro

Read PE, Preece JE (2003) Environmental management for optimizing micropropagation. *Acta Horticulturae* **616**:129-133

Revilla MA, Majada J, Rodriguez R (1989) Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation. *Annals of Forest Science* **46**:149-151

Riov J (1993) Endogenous and exogenous auxin conjugates in rooting of cuttings. *Acta Horticulturae* **329**:284-288

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. *Horticultural Science* **8**:29-32

Rodríguez R (1982) Stimulation of multiple shoot-bud formation in walnuts seeds. *Horticultural Science* **17**:592

Rodríguez R, Revilla A, Albuerne M, Perez C (1989) Walnut (*Juglans* spp.). In YPS Bajaj, eds, *Trees II, Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Ed 1, Vol 5. Springer, New York, pp 99-126

Rohr R, Iliev I, Scaltsoyiannes A, Tsoulpha P (2003) Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Horticulturae* **616**:59–69

Rom RC (1987) Roots. In RC Rom, RF Carlson, eds, *Rootstocks for fruit crops*, Ed 1, Vol 1. John Willey and Sons, New York, pp 5-28

Rufato AR, Rufato L, Hipólito JS (s.d.). Porta enxertos para ameixeira. A cultura da ameixeira, Série Fruticultura, pp 49-67

Rugini E (1984) *In vitro* propagation of some olive cultivars with different root-ability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* **24**:123-134

Saadat YA, Hennerty MJ (2001) Effects of different *in vitro* and *ex vitro* treatments on the rooting performance of persian walnut (*Juglans regia* L.) microshoots. *Acta Horticulturae* **544**:473–480

Saadat YA, Hennerty MJ (2002) Factors affecting the shoot multiplication of persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae* **95**:251–260

Scaltsoyiannes A, Tsoulpha P, Panetsos KP, Moulalis D (1997) Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia* L.). *Silvae Genetica* **46**:326-332

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal Botânica* **50**:199-204

Schübler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycology Research* **105**:1413-1421

Sepahvand S, Ebadi A, Kamali K, Ghaemmaghani SA (2012) Effects of myo-inositol and thiamine on micropropagation of GF677 (peach × almond hybrid). *Journal of Agricultural Science* **4**:275-280

Sharifmoghaddam N, Safarnejad A, Tabatabaei SM (2011) The effect of plant growth regulators on *callus* induction and regeneration of GF677 rootstock. *International Journal of Science and Nature* **2**:805-808

Simpósio Nacional de Frutos Secos (2016) Alternativas para a instalação de novos pomares de nogueiras. Como garantir níveis de produtividade desta exigente cultura?. Projeto “VALREGIA”: Viabilização da cultura da nogueira no regadio do Alentejo, Ferreira do Alentejo, 30 de Junho de 2016, http://esa.ipb.pt/cncfs/images/doc_simposio_fa_2016/Novas_estrategias_-_Mota.pdf. Página visualizada em 2016

Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**:118–131

Slater A, Scott NW, Fowler MR (2008) *Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants*, Ed 2, Vol 1. Oxford University Press Inc, Oxford, pp 35-53

Spethmann W, Hamzah A (1988) Growth hormone induced root system types in cuttings of some broad leaved tree species. *Acta Horticulturae* **226**:601-605

Stanford AM, Harden R, Parks CR (2000) Phylogeny and Biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on mATK and ITS sequence data. *American Journal of Botany* **87**:872

Styliandes DC, Syrgianidis GD, Almaliotis DD (1988) The peach rootstocks: A review of bibliography with relative observations in Greece. *Agricultural Technology* **12**:34-69

Sutter EG (1996) General laboratory requirements, media and sterilization methods. In RN Trigiano, DJ Gray, eds, Plant tissue culture concepts and laboratory exercises, Ed 1, Vol 1. CRC Press, New York, pp 11-25

Tabachnik L, Kester DE (1977) Shoot culture for almond and almond peach hybrid clones *in vitro*. Horticultural Science **12**:545-547

Tapsell LC, Gillen LJ, Patch CS, Batterham M, Owen A, Baré M, Kennedy M (2004) Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care **27**:2777

The Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT) (2015) <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Página visualizada em 2016

Trigiano RN, Gray DJ (2005) Plant Development and Biotechnology. CRC Press Inc, Boca Raton

Tsipouridis C, Thomidis T (2003) Methods to improve the *in vitro* culture of GF677 (peach × almond) peach rootstock. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science **31**:361-364

University of California (UC Davis) (2016) Walnut deficiencies and pests. Fruit and Nut Research and Information Center (Department of Plant Sciences, College of Agricultural and Environmental Sciences, University of California, Davis), Fruit and nut information, Walnut, Walnut Education, reviewed by UC Specialists and Farm Advisors, http://fruitandnuteducation.ucdavis.edu/fruitnutproduction/Walnut/Walnut_DeficienciesPests/. Página visualizada em 2016

Vaez-Livari B, Salehi-Soghadi Z (2005) *In vitro* rooting of hybrid GF677 (*Prunus dulcis* × *Prunus persica*). ISHS Acta Horticulturae 726, IV International Symposium on Pistachios Almonds

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. Horticultural Science **39**:324-327

Vasil IK, Ahuja MR, Vasil V (1979) Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. Advances in Genetics **20**:127-215

Yari MB, Gholami M, Esna-Ashari M, kheradmand H (2014b) Effect of season and explant type on *in vitro* propagation of *Juglans regia* L. genotypes Z60 and Z63. International Journal of Agriculture and Crop Sciences **7**:624-629

Yari MB, Gholami M, Khazaei I (2014a) Impact of media and different cytokinins concentrations on *in vitro* shoot multiplication of persian walnut (*Juglans regia* L.). International Journal of Farming and Allied Sciences **3**:203-209

Capítulo 7 - Anexos

Anexo 1 - Plantas-mãe



Fig.42 - Plantas-mãe de GF677.



Fig.43 - Plantas-mãe de Vlach.

Anexo 2 - Indução da formação de rebentos epicórmicos em GF677 e Vlach



Fig.44 – Pré-tratamento antifúngico com Switch® dos ramos adultos de GF677 e Vlach.



Fig.45 - Secagem do material vegetal ao ar livre. Na figura é apresentado material vegetal de GF677 (à esquerda) e de Vlach (à direita).



Fig.46 - Material vegetal acondicionado num saco plástico devidamente identificado, e de seguida, sujeito a um tratamento pelo frio.



Fig.47 - Material vegetal de GF677, após 43 dias de tratamento pelo frio. Na figura são apresentados os clones I, II, III e IV de GF677 (da esquerda para a direita).



Fig.48 - Material vegetal do clone 0 de Vlach, após 99 (à esquerda) e 90 (à direita) dias de tratamento pelo frio.



Fig.49 - Indução da formação de rebentos epicórmicos nos ramos adultos de GF677 e Vlach.

Anexo 3 - Meio MS (meio basal)



Formulations & Specifications

Murashige & Skoog Basal Salts

Product Number MSP01-1LT

With macronutrients and micronutrients as described by
Murashige and Skoog, 1962. Store at 2° to 8°C.

Components	mg/L
Ammonium Nitrate (NH_4NO_3)	1650.0000
Boric Acid (H_3BO_3)	6.2000
Calcium Chloride, Anhydrous (CaCl_2)	332.2000
Cobalt Chloride, Hexahydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.0250
Cupric Sulfate, Pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.0250
EDTA, Disodium, Dihydrate ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.2600
Ferrous Sulfate, Heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8000
Magnesium Sulfate, Anhydrous (MgSO_4)	180.7000
Manganese Sulfate, Monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.9000
Molybdc Acid Sodium Salt, Dihydrate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.2500
Potassium Iodide (KI)	0.8300
Potassium Nitrate (KNO_3)	1900.0000
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous (KH_2PO_4)	170.0000
Zinc Sulfate, Heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.6000

Anexo 3 - Meio MS (vitaminas)



Formulations & Specifications

Murashige & Skoog Vitamin Solution

Product Number MVL01-100ML

Contains the vitamins as described by Murashige and Skoog, 1962. 1000X Solution. Store at 2° to 8°C.

Components	mg/L
Glycine ($C_2H_5NO_2$)	2000.0000
Myo-Inositol ($C_6H_{12}O_6$)	100000.0000
	0
Nicotinic Acid ($C_6H_5NO_2$)	500.0000
Pyridoxine, Hydrochloride ($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$)	500.0000
Thiamine, Hydrochloride ($C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$)	100.0000

Anexo 4 - Meio WPM (meio basal)



Formulations & Specifications

Lloyd & McCown's Woody Plant Basal Salts

Product Number WPP03-1LT

With macronutrients and micronutrients as described by
Lloyd and McCown, 1981. Store at 2° to 8°C.

Components	mg/L
Ammonium Nitrate (NH_4NO_3)	400.0000
Boric Acid (H_3BO_3)	6.2000
Calcium Chloride, Anhydrous (CaCl_2)	72.4700
Calcium Nitrate, Tetrahydrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	556.0000
Cupric Sulfate, Anhydrous (CuSO_4)	0.1600
EDTA, Disodium, Dihydrate ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.3000
Ferrous Sulfate, Heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8600
Magnesium Sulfate, Anhydrous (MgSO_4)	180.7000
Manganese Sulfate, Monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	22.3000
Molybdic Acid Sodium Salt, Dihydrate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.2500
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous (KH_2PO_4)	170.0000
Potassium Sulfate, Anhydrous (K_2SO_4)	990.0000
Zinc Sulfate, Heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.6000

Anexo 4 - Meio WPM (vitaminas presentes na formulação WPP04)



Comparative Formulation Woody Plant

 Powdered Media	WPP03	WPP04
Macronutrients	mg/L	mg/L
Ammonium Nitrate	400.0000	400.0000
Calcium Chloride, Anhydrous	72.4700	72.4700
Calcium Nitrate, Tetrahydrate	556.0000	556.0000
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7000	180.7000
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous	170.0000	170.0000
Potassium Sulfate, Anhydrous	990.0000	990.0000
Micronutrients	mg/L	mg/L
Boric Acid	6.2000	6.2000
Cupric Sulfate, Anhydrous	0.1600	0.1600
EDTA, Disodium, Dihydrate	37.3000	37.3000
Ferrous Sulfate, Heptahydrate	27.8500	27.8500
Manganese Sulfate, Monohydrate	22.3000	22.3000
Molybdic Acid Sodium Salt, Dihydrate	0.2500	0.2500
Zinc Sulfate, Heptahydrate	8.6000	8.6000
Other Components	mg/L	mg/L
Glycine		2.0000

 Powdered Media	WPP03	WPP04
Vitamins	mg/L	mg/L
Myo-Inositol		100.0000
Nicotinic Acid		0.5000
Pyridoxine, Hydrochloride		0.5000
Thiamine, Hydrochloride		1.0000

Anexo 5 - Meio DKW (meio basal)



Formulations & Specifications

DKW Basal Salts

Product Number DKP01-1LT

With macronutrients and micronutrients as described by Driver and Kuniyuki (1984) and McGranahan et al. (1987). Store at 2° to 8°C.

Components	mg/L
Ammonium Nitrate (NH_4NO_3)	1416.0000
Boric Acid (H_3BO_3)	4.8000
Calcium Chloride, Anhydrous (CaCl_2)	112.5000
Calcium Nitrate, Tetrahydrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1367.0000
Cupric Sulfate, Pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.2500
EDTA, Disodium, Dihydrate ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	45.5000
Ferrous Sulfate, Heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	33.8000
Magnesium Sulfate, Anhydrous (MgSO_4)	361.4900
Manganese Sulfate, Monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	33.5000
Molybdic Acid Sodium Salt, Dihydrate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.3900
Nickel Sulfate, Hexahydrate ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.0050
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous (KH_2PO_4)	265.0000
Potassium Sulfate, Anhydrous (K_2SO_4)	1559.0000
Zinc Nitrate, Hexahydrate ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	17.0000

Anexo 5 - Meio DKW (vitaminas presentes na formulação DKP02)



Comparative Formulation DKW

 Powdered Media	DKP01	DKP02	
Macronutrients	mg/L	mg/L	
Ammonium Nitrate	1416.0000	1416.0000	
Calcium Chloride, Anhydrous	112.5000	112.5000	
Calcium Nitrate, Tetrahydrate	1367.0000	1367.0000	
Magnesium Sulfate, Anhydrous	361.4900	361.4900	
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous	265.0000	265.0000	
Potassium Sulfate, Anhydrous	1559.0000	1559.0000	
Micronutrients	mg/L	mg/L	
Boric Acid	4.8000	4.8000	
Cupric Sulfate, Pentahydrate	0.2500	0.2500	
EDTA, Disodium, Dihydrate	45.5000	45.5000	
Ferrous Sulfate, Heptahydrate	33.8000	33.8000	
Manganese Sulfate, Monohydrate	33.5000	33.5000	
Molybdic Acid Sodium Salt, Dihydrate	0.3900	0.3900	
Nickel Sulfate, Hexahydrate	0.0050	0.0050	
Zinc Nitrate, Hexahydrate	17.0000	17.0000	
Other	mg/L	mg/L	
Glycine		2.0000	

 Powdered Media	DKP01	DKP02	
Vitamins	mg/L	mg/L	
Myo-Inositol		100.0000	
Nicotinic Acid		1.0000	
Thiamine, Hydrochloride		2.0000	

Anexo 6 - Meio MS_{1/2}nitratos (meio basal)



Formulations & Specifications

Murashige & Skoog with Reduced Nitrates

Product Number MSP16-1LT

With macronutrients and micronutrients as described by Murashige and Skoog, 1962. Modified to contain 1/2 the concentration of ammonium nitrate and potassium nitrate. Store at 2° to 8°C.

Components	mg/L
Ammonium Nitrate (NH ₄ NO ₃)	825.0000
Boric Acid (H ₃ BO ₃)	6.2000
Calcium Chloride, Anhydrous (CaCl ₂)	332.2000
Cobalt Chloride, Hexahydrate (CoCl ₂ . 6H ₂ O)	0.0250
Cupric Sulfate, Pentahydrate (CuSO ₄ . 5H ₂ O)	0.0250
EDTA, Disodium, Dihydrate (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ . 2H ₂ O)	37.2600
Ferrous Sulfate, Heptahydrate (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27.8000
Magnesium Sulfate, Anhydrous (MgSO ₄)	180.7000
Manganese Sulfate, Monohydrate (MnSO ₄ . H ₂ O)	16.9000
Molybdic Acid Sodium Salt, Dihydrate (Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O)	0.2500
Potassium Iodide (KI)	0.8300
Potassium Nitrate (KNO ₃)	950.0000
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous (KH ₂ PO ₄)	170.0000
Zinc Sulfate, Heptahydrate (ZnSO ₄ . 7H ₂ O)	8.6000