

# Micropropagação in vitro da noqueira (*Juglans regia* L.) por rebentação axilar

Maria José Cardoso Lopes

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção da licenciatura de Engenharia Biológica e Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Teresa Coelho, Professora adjunta do Departamento da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer profundamente ao responsável pela possibilidade de desenvolver esta investigação no laboratório de biotecnologia vegetal da Universidade de Évora, Professor Augusto Peixe. Na qualidade de meu orientador de estágio, um muito obrigado pela simpatia, paciência, conhecimentos técnicos científicos transmitidos e pela leitura do manuscrito.

À professora Teresa Coelho pela atenção, apoio e confiança dadas ao longo de todo o trabalho.

À técnica de laboratório Virgínia Sobral, pela integração na equipa de trabalho, por todos os conhecimentos técnico-científicos transmitidos ao longo do estágio e todo o carinho.

A todas as pessoas que tive a sorte de conhecer e que me deram força para que isto se tornasse possível, Rong, Caroline, Luz, Elizete, Daniel, Cláudia, Sara, Catarina, Vanessa e Pedro Pereira.

A todos os meus amigos, especialmente à Neuza Nunes, Daniela Nunes, Ana Lourenço, Patrícia Jegundo e Andreia Santos pelo apoio e confiança que depositaram em mim desde o início.

Aos meus pais, às minhas irmãs, à minha avó, à minha Tia Maria José e aos meus primos Luís e Salomé, pelo incentivo, coragem, pela força e orgulho que demonstrarem ao longo de todo o percurso académico.

Ao meu arco íris, Hugo Daniel, por todo o apoio, orgulho e alegria demonstrados ao longo de todo este percurso.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram ...

**Muito Obrigado!**

# Micropropagação *in vitro* da nogueira (*Juglans regia* L.) por rebentação axilar

Maria José Cardoso Lopes

## Palavras chave

*Juglans regia* L., cultura *in vitro*, benzilaminopurina, taxa multiplicação, enraizamento

## Resumo

A micropropagação tem demonstrado grande importância prática e potencial nas áreas agrícola e florestal bem como na pesquisa básica. Nas plantas lenhosas, como a nogueira, o processo de multiplicação por via seminal conduz a uma elevada variabilidade, devido ao nível de heterozigocidade das espécies, o que compromete a uniformidade das plantações e o sucesso da cultura. Por sua vez, os processos clássicos de propagação vegetativa são frequentemente de difícil execução e com uma baixa taxa de sucesso associada. Por isso, é necessário recorrer a outros métodos de propagação. O método adoptado nestes ensaios foi a multiplicação *in vitro* por rebentação axilar.

Apresentam-se resultados das diferentes fases do processo, desde a instalação das culturas até à sua aclimatização. Na fase de instalação apresentam-se dados relacionados com as taxas de contaminação observadas em explantes de *Juglans regia* cv. 'Howard'. A taxa de multiplicação total, taxa de rebentação múltipla, taxa de explantes evoluídos e comprimento médio dos rebentos foram os parâmetros analisados na fase de multiplicação, onde se utilizou o porta-enxerto híbrido 'Paradox', tendo os melhores resultados sido conseguidos com a utilização de  $1\text{mg l}^{-1}$  de BAP e  $0,01\text{ mg l}^{-1}$  de IBA.

Na fase de enraizamento e aclimatização também realizada com o porta-enxerto 'Paradox' foram testados vários tratamentos, tendo-se verificado que a utilização de vermiculite, na fase de expressão rizogénica, melhorou significativamente tanto a percentagem de enraizamento como a qualidade do sistema radical.

# Micropropagação *in vitro* da noqueira (*Juglans regia* L.) por rebentação axilar

Maria José Cardoso Lopes

## Keywords

*Juglans regia* L., *in vitro* culture, benzilaminopurine, multiplication rate, rooting

## Abstract

Micropropagation has shown great practical importance and potential agricultural areas in the forest as well as in basic research. In woody plants such as walnut, the multiplication process by seminal leads to a high variability due to the level of heterozygosity of the species, which compromises the uniformity of the plantation culture and success. In turn, the classical processes of vegetative propagation are often difficult to perform and with a low success rate associated. It is therefore necessary to resort other methods of propagation. The method adopted in these experiments was the *in vitro* multiplication by axillary surf.

We present results the different stages of the process, from installation to the cultures of their acclimatization. In the installation phase presents data related to the infection rate observed in explants of *Juglans regia* cv.'Howard'. The multiplication rate, total surf multiple, explants evolved rate and average length of shoots were the parameters analyzed in the multiplication phase, which was used for the rootstock hybrid 'Paradox', with the best results were achieved with the use of 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP and 0,01 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA.

In the rooting stage and acclimatization also performed with the rootstock 'Paradox' various treatments were tested, it was found that the use of vermiculite in the phase rhizogenic expression significantly improved both the percentage of rooting and the quality of the root system.

# Índice geral

|  |    |
|--|----|
| 1. Introdução .....  | 1  |
| 2. Revisão Bibliográfica .....   | 4  |
| 2.1. Características gerais da espécie .....   | 4  |
| 2.2. Aspectos gerais sobre a multiplicação <i>in vitro</i> com ênfase na micopropagação da<br>nogueira ..... | 5  |
| 2.2.1. Importância e potencialidades da técnica .....  | 5  |
| 2.3. Iniciação de culturas assépticas .....  | 6  |
| 2.3.1. Desinfecção dos explantes .....   | 6  |
| 2.4. Multiplicação <i>in vitro</i> .....   | 7  |
| 2.4.1. Factores que afectam a multiplicação <i>in vitro</i> .....  | 8  |
| 2.4.1.1. Espécie/cultivar/genótipo .....   | 8  |
| 2.4.1.2. A composição mineral do meio de cultura .....   | 9  |
| 2.4.1.3. Fonte de carbono .....  | 9  |
| 2.4.1.4. Efeito dos reguladores de crescimento na fase de multiplicação .....                                | 10 |
| 2.4.1.5. Agente gelificante .....  | 11 |
| 2.4.1.6. Luz .....   | 12 |
| 2.4.1.7. Temperatura .....   | 12 |
| 2.5. A fase de enraizamento dos explantes .....  | 13 |
| 2.5.2. Influência do genótipo no enraizamento .....  | 13 |
| 2.5.3. Composição mineral dos meios de cultura .....   | 14 |
| 2.5.4. Os hidratos de carbono no meio de enraizamento .....  | 17 |
| 2.5.5. Carvão activado .....   | 17 |
| 2.5.6. Influência dos reguladores de crescimento no enraizamento .....                                       | 18 |
| 2.5.7. Influência da vermiculite no enraizamento .....   | 19 |
| 2.5.8. Infecção com <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....  | 20 |
| 2.6. Aclimatização .....   | 20 |
| 3. Materiais e Métodos .....   | 22 |
| 3.1. Material vegetal .....  | 22 |
| 3.2. Condições de cultura .....  | 22 |
| 3.2.1. Sala de Cultura <i>in vitro</i> .....   | 22 |
| 3.2.2. Sala de aclimatização .....   | 22 |
| 3.3. Esterilização e condições de assepsia .....   | 22 |
| 3.3.1. Esterilização de meios de cultura, recipientes e outro material de apoio .....                        | 22 |
| 3.3.2. Desinfecção do material vegetal .....   | 23 |
| 3.4. Manuseamento do material <i>in vitro</i> .....  | 24 |
| 3.4.1. Estabelecimento das culturas .....  | 24 |
| 3.4.2. Fase de multiplicação .....   | 25 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4.3 Fase de Enraizamento .....  | 26 |
| 3.4.4. Fase de Aclimatização.....   | 28 |
| 3.5. Delineamento experimental, recolha e análise de dados .....  | 29 |
| 4. Resultados e Discussão.....  | 30 |
| 4.1 Contaminações e viabilidade dos explantes na fase de estabelecimento das culturas ..                                | 30 |
| 4.2. Resposta dos explantes em cultura na fase de multiplicação .....   | 31 |
| 4.2.1 Influência dos factores em estudo noutros parâmetros para além da taxa de multiplicação total - Subcultura 2..... | 33 |
| 4.3 Enraizamento .....  | 35 |
| 4.4 Aclimatização .....   | 36 |
| 5. Considerações Finais .....   | 37 |
| 6. Bibliografia.....  | 38 |
| 7. Anexo I.....   | 39 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Repartição regional da área e do nº de explorações por classe de área (Fonte: INE-Recenseamento geral da agricultura 1999) .....  | 1  |
| Figura 2: A) <i>Juglans regia</i> cv. 'Persian' B) Fruto C) flores femininas D) flores masculinas .....   | 4  |
| Figura 3: Taxas de proliferação em WPM com diferentes concentrações de BAP/IBA (Zamora <i>et al.</i> , 2004).....   | 10 |
| Figura 4: taxas de multiplicação <i>in vitro</i> usando material adulto ('Serr' e MBT-T-231) e jovem (SBE 4, SBE 5, SBE 11, SBE 15, SBE21, SBE22, SBE 26, SBE 27) de clones de <i>Juglans regia</i> , após 5 a 15 repicagens em meio de multiplicação (fonte: Dolcet-Sanjuan <i>et al.</i> , 1996)..... | 15 |
| Figura 5: Percentagem de germinação <i>in vitro</i> em 4 meios de cultura. Cada ponto representa a média de três repicagens (Fonte: Zamora <i>et al.</i> , 2004) .....  | 16 |
| Figura 6: Desenvolvimento dos embriões, nos diferentes meios de cultura, no final da experiência (Fonte: Zamora <i>et al.</i> , 2004) .....   | 16 |
| Figura 7: Efeito da concentração de sacarose no meio de expressão no A) Nº de raízes secundárias por raiz, e B) na percentagem de plantas aclimatizadas de <i>Juglans regia</i> cv. 'Serr'(fonte: Dolcet-Sanjuan <i>et al.</i> , 1996) .....  | 17 |
| Figura 8: a) comprimento da estaca vinda do campo; b) Execução do primeiro corte; c) fase de corte completa.....  | 23 |
| Figura 9: a) imersão das estacas em água corrente; b) estacas sob agitação de uma placa e em contacto com a solução bicloreto de mercúrio 0,2% + tween 20; c) lavagem com água bidestilada estéril, após extracção da solução desinfectante; d) extracção da água de lavagem .....                      | 24 |
| Figura 10: a) Excisão das estacas com recurso a pinça e bisturi; b) corte dos extremos o mais perto possível do nó, isolando o gomo; c) inoculação de um gomo axilar/terminal por tubo de ensaio .....  | 25 |
| Figura 11: repicagem do material vegetal .....  | 26 |
| Figura 12: a) Rebentos prontos para a fase de indução radicular b) inoculação dos rebentos no meio de indução .....   | 27 |
| Figura 13: a) Material usado na passagem dos rebentos b) extracção do rebento do meio de indução c) Humedecimento da vermiculite com meio DKWRE d) colocação do rebento na vermiculite já humedecida .....  | 28 |
| Figura 14: Contaminações resultantes da desinfecção com ou sem PPM .....  | 30 |
| Figura 15: a) contaminação por via bacteriana b) contaminação por via fúngica .....   | 31 |
| Figura 16: Taxas de multiplicação totais em função do meio de cultura, do tio de gomo e da subcultura, (LSD 95%) .....  | 33 |
| Figura 17: Comportamento dos parâmetros analisados na subcultura 2, em função do meio de cultura e do tipo de gomo (LSD 95%).....   | 34 |
| Figura 18: Influência da passagem por vermiculite na fase de expressão radical.....   | 35 |
| Figura 19: Sistema radicular dos explantes em agar e sem passagem por vermiculite .....   | 36 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 20: Sistema radicular dos explantes com passagem por vermiculite .....   | 36 |
| Figura 21: Percentagem de sobrevivência das plantas com e sem raízes visíveis, e com/sem passagem pela vermiculite..... | 36 |
| Figura 22: Plantas aclimatizadas com sucesso vermiculite .....  | 36 |

## Índice de tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Produtividade por hectare por região e evolução da superfície e da produção nos anos 2004 e 2005 (Fonte: INE 1999 e FAO) .....   | 2  |
| Tabela 2: comércio internacional em Portugal da noz com casca, por país (Fonte: INE) .....   | 2  |
| Tabela 3: Taxa de multiplicação do estabelecimento de genótipo de noqueira' Persian' após 13 sub-culturas (Fonte: Vahdati <i>et al.</i> , 2009) .....  | 8  |
| Tabela 4: Respostas dos explantes de noqueira Persa aos diferentes meios de cultura e agentes gelificantes (Fonte: Saadat and Hennerty, 2002) .....  | 12 |
| Tabela 5: capacidade de enraizamento dos genótipos dos explantes estabelecidos <i>in vitro</i> (Fonte: Vahdati <i>et al.</i> , 2009) .....   | 14 |
| Tabela 6: Efeito da variação da duração do pré-tratamento no escuro, 3 e 6 dias, em dois clones de <i>Juglans regia</i> (Fonte: Scaltsoyiannes <i>et al.</i> , 1997) .....   | 18 |
| Tabela 7: Efeito da granulometria da vermiculite (tipo I e II) no enraizamento de clones de <i>J.regia</i> P <sub>3</sub> e P <sub>7</sub> , no meio DKW (1/4 dos macronutrientes) sem hormonas (fonte: Scaltsoyiannes <i>et al.</i> , 1997) .....                 | 19 |
| Tabela 8: Efeito da cultivar e substrato na percentagem de enraizamento, no nº de raízes primárias e formação de raízes secundárias na noqueira Shinano, após 30 dias em cultura num meio de desenvolvimento da raiz (Fonte: Tetsumura <i>et al.</i> , 2002) ..... | 20 |
| Tabela 9: Resultados da análise de variância. Análise conjunta do comportamento dos factores em estudo, para as duas subculturas realizadas .....  | 32 |

## Lista de Abreviaturas

BAP- Benzilaminopurina

cm- centímetro

DKW- Driver e Kuniyuki

FAO- Food and Agriculture Organization

gl<sup>-1</sup>- grama por litro

IBA- Ácido-indol-3-butírico

NAA- Ácido naftalenacético

mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>-miligrama por litro

MS-Murashige e skoog

PPM- Plant mixture Preservative

WPM-woody plant medium

w\m<sup>2</sup>- watt por metro quadrado

μmol- micromole